

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Estudio de la regulación y función del gen
homeótico *Ultrabithorax* de *Drosophila
melanogaster***

Daniel López Garaulet
Tesis Doctoral
Madrid, 2011

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio de la regulación y función del gen
homeótico *Ultrabithorax* de *Drosophila
melanogaster***

Memoria presentada por

Daniel López Garaulet

para optar al grado de Doctor en Ciencias por

la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2011

Director de Tesis:

Prof. Ernesto Sánchez-Herrero Arbide

A mis padres.

_índice:

_Resumen	10
_Summary	14
_Abreviaturas	18
_Introducción	20
La Biología del desarrollo	22
<i>Drosophila melanogaster</i>	23
La información posicional en el desarrollo: definición	
del eje antero-posterior en <i>Drosophila</i>	25
Los genes Hox	26
Regulación de los genes Hox: los genes <i>Polycomb</i> y <i>Trithorax</i>	30
<i>Ultrabithorax</i>	32
Los discos imaginales	34
Subdivisión genética del disco de ala. Compartimentos	35
Establecimiento del patrón y crecimiento en	
el disco imaginal de ala	36
Los genes Hox y el control del tamaño	38
El desarrollo pupal del tórax	39
_Objetivos	42
_Materiales y métodos	46
_Resultados	60
A. ESTUDIO DE LA AUTORREGULACIÓN NEGATIVA DEL	
GEN <i>Ultrabithorax</i> EN <i>Drosophila melanogaster</i>	62
La sobreexpresión de <i>Ubx</i> produce fenotipos de	
falta de función de <i>Ubx</i>	62
Las transformaciones de halterio en ala son	
debidas a la falta de la proteína <i>Ubx</i>	64
La inhibición de la expresión de <i>Ubx</i> se debe	

a una represión de la transcripción	66
El aumento transitorio de los niveles de	
<i>Ubx</i> provoca la ausencia permanente de proteína <i>Ubx</i>	69
La síntesis de <i>Ubx</i> puede reiniciarse tras	
una ausencia del producto homeótico	75
La represión de <i>Ubx</i> se mantiene de forma autónoma celular	77
Represión permanente de una línea <i>Ubx</i> -Gal4 insertada cerca	
de un elemento de respuesta a Polycomb (PRE)	78
La represión permanente de <i>Ubx</i> depende	
de proteínas del grupo Polycomb y trithorax	81
El gen Hox <i>abd-A</i> es también capaz de generar	
un mecanismo de represión permanente de <i>Ubx</i>	85
El dominio UbdA de la proteína <i>Ubx</i> podría	
ser necesario para su represión permanente	87
El gen <i>engrailed</i> también se reprime permanente	
por altos niveles de su proteína	89
<i>abd-A</i> y <i>Abd-B</i> no muestran represión permanente	
en respuesta a niveles elevados de sus productos	91
Mecanismo de autorepresión de <i>Ubx</i> durante el	
desarrollo del individuo silvestre	92
ESTUDIO DEL CONTROL DEL TAMAÑO DEL NOTUM POR	
EL GEN <i>Ultrabithorax</i> DURANTE LA METAMORFOSIS	
DE <i>Drosophila melanogaster</i> .	96
El fragma mesotorácico	97
Cuantificación del tamaño celular en el notum	101
Estimación del número de células en meso y metanotum	103
El mesonotum prolifera durante la metamorfosis	
pero no así el metanotum	106
_Discusión	108
_Conclusiones	122
_Bibliografía	126
–Anexo I: Publicaciones	140

resumen

En la mayoría de los organismos bilaterales, los genes Hox determinan la identidad segmental a lo largo de eje anteroposterior. Dado el papel crucial de estos genes durante el desarrollo, su expresión debe estar estrechamente regulada. Por otra parte, su función controla muchos aspectos del desarrollo, incluida la regulación del tamaño de las células y los órganos

El gen *Ultrabithorax* (*Ubx*) de *Drosophila* especifica el tercer segmento torácico y el primer segmento abdominal. Su expresión está controlada por varios mecanismos, la mayoría comunes al resto de genes Hox, pero posee también un nivel adicional de regulación consistente en la regulación negativa por su propio producto. En esta tesis mostramos cómo, si los niveles de *Ubx* son indebidamente elevados se establece una represión permanente de *Ubx*. Esta represión se hace independiente de la presencia de *Ubx* exógeno y genera el paradójico fenómeno de que un exceso de proteína homeótica produce fenotipos típicos de pérdida de la misma. La represión permanente depende de genes pertenecientes al grupo *Polycomb* (*Pc*). La ausencia de transcripción del *Ubx* endógeno cuando los niveles de proteína son muy elevados probablemente activa los complejos *Pc* mediante un elemento de respuesta a *Pc* localizado en un intrón de *Ubx*. Esto provoca la inhibición permanente de su transcripción. Se han obtenido resultados similares con el gen *engrailed*, mostrando que este mecanismo de represión permanente puede ser común a otros genes con autorregulación negativa cuando su expresión aumenta transitoriamente.

De entre todas las funciones de los genes Hox, su control sobre el crecimiento de los órganos ha intrigado especialmente a los científicos. Las proporciones de un animal dependen del correcto tamaño de cada segmento y esto, en última instancia, se controla por los genes Hox. En *Drosophila*, el ala y el halterio son apéndices homólogos presentes en el segundo y tercer segmento torácico, respectivamente, pero su tamaño en el individuo adulto es muy diferente. *Ubx* se expresa en las células del halterio durante todo el desarrollo, donde se ha demostrado que regula a distintos niveles diferentes vías de señalización implicadas en crecimiento.

En esta tesis mostramos cómo el plan de crecimiento en la región de notum del ala (mesonotum) y de halterio (metanotum) es completamente diferente durante la metamorfosis. El mesonotum adquiere un tamaño más grande que el metanotum principalmente por proliferación celular durante la pupación, proceso que está inhibido específicamente en el metanotum. Sin embargo, aunque el metanotum es una estructura mucho más pequeña que el mesonotum, sus células aumentan su volumen hasta alcanzar un tamaño final casi tres veces mayor que el de las células del mesonotum. Concluimos que *Ubx* regula el tamaño en las regiones proximal del T2 y T3 dorsal por mecanismos diferentes, controlando la división celular para hacer que la parte proximal del T3 sea más pequeña que la del T2.

summary:

In most bilaterians, the Hox genes determine the segmental identity along the anteroposterior axis. Given this crucial role in development, their expression must be tightly regulated. On the other hand, its function controls many aspects of development, including the regulation of cell and organ size.

The *Ultrabithorax (Ubx)* gene of *Drosophila* specifies the third thoracic and first abdominal segments. *Ubx* expression is controlled by several mechanisms, most of them common to the rest of the Hox genes, but also shows a particular, additional level of regulation consisting in a negative regulation by its own product. In our work we have shown that if *Ubx* expression levels are inappropriately elevated, overriding the auto regulatory control, a permanent repression of *Ubx* is established. This continuous repression becomes independent of the presence of exogenous *Ubx* and leads to the paradoxical result that an excess of *Ubx* results in a phenotype of *Ubx* loss. The mechanism of permanent repression depends on the *Polycomb*-group genes. Absence of endogenous *Ubx* transcription when *Ubx* levels are highly elevated probably activates *Polycomb* complexes through a *Polycomb* response element located in the *Ubx* major intron. This, in turn, brings about permanent repression of *Ubx* transcription. Similar results are obtained with the gene *engrailed*, showing that this mechanism of permanent repression may be a general one for genes with negative auto-regulation when levels of expression are transitorily elevated.

Amongst the functions of Hox genes in the development of a whole segment, one that has particularly intrigued researchers in the last few years is the control of organ growth. The final proportions of an animal depend on the proper size of every segment and this, in turn, is controlled by the Hox genes. In *Drosophila*, wings and halteres are homologous appendages present in the second and third thoracic segments, respectively, that greatly differ in size. *Ubx* is expressed in the cells of the developing haltere where it has been shown to regulate several signalling pathways involved in growth. We have turned our attention to a different region of the wing and haltere discs and shown how the growth plan in the notum region of wing (mesonotum) and haltere (metanotum) is completely different during metamorphosis. The mesonotum achieves a greater size than the metanotum mainly by cell proliferation during pupation, which is specifically inhibited in the metanotum. However, although the metanotum is a much smaller structure, its cells increase their volume to reach a final size nearly 3 times bigger than that of mesonotum cells. We conclude that *Ubx* regulates size in the distal and proximal parts of the disc by different mechanisms, and that during pupation it controls cell division to make the proximal part of the T3 smaller than that of the T2.

abreviaturas:

A → anterior
A/P → antero-posterior
A1 → primer segmento abdominal
abd-A → *abdominal-A*
Abd-B → *Abdominal-B*
abx → *anterobithorax*
ANT-C → *complejo Antennapedia*
Antp → *Antennapedia*
ap → *apterous*
AS-C → *achaete-scute*
BMP → Bone Morfogenetic proteins
bx → *bithorax*
BX-C → *complejo Bithorax*
bxd → *bithoraxoid*
°C → grado centígrado
C-Iro → *complejo iroquois*
ci → *cubitus interruptus*
d → dorsal
Dfd → *Deformed*
dll → *distalless*
DNA → ácido desoxirribonucleico
DNAc → DNA copia
dpp → *decapentaplegic*
EGFR → *receptor del factor de crecimiento epidérmico*
en → *engrailed*
en → *engrailed*
esg → *escargot*
flp → *flipasa*
FRT → flipase recombination target
GFP → green fluorescent protein
h → horas
HD → homeodominio
hh → *hedgehog*
Hs → heat shock
HX → hexapeptido
lab → *labial*
MARCM → mosaic analysis with a repressible cell marker
min → minutos
N → *Notch*
omb → *optomotorblind*
p → posterior
P-mad → *Mad fosforilado*
pb → *proboscipedia*
pbx → *postbithorax*
Pc → *Polycomb*

PgG → grupo Polycomb
Plc → Polycomblike
 PRC → Polycomb Repressive Complex
 PRE → elemento de respuesta a Polycomb
 PS → parasegmentos
ptc → *patched*
 RFP → red florescent protein
 RNA → ácido ribonucleico
 RNAm → RNA mensajero
salr → *spalt-related*
Scr → *Sex combs reduced*
sd → *scalloped*
Smo → *Smoothened*
 T1 → primer segmento torácico
 T2 → segundo segmento torácico
 T3 → tercer segmento torácico
TGF-β → *Transfforming growth Factors beta*
tkv → *thick veins*
 TRE → elementos de respuesta a trithorax
 TOPRO → TO-PRO-3 iodide
trx → *trithorax*
trxG → grupo trithorax
tub → *tubulina*
 UAS → upstream activator sequence
Ubx → *Ultrabithorax*
v → ventral
vg → *vestigial*
vgQ → *vestigial quadrant enhacer*
w → *white*
wg → *Wingless*
y → *yellow*
 YFP → yellow fluorescente proteína

introducción

La Biología del desarrollo:

La continuidad de la vida depende de la capacidad de los individuos de autoperpetuarse, es decir, de producir nuevos organismos semejantes a ellos. Este proceso recibe el nombre de reproducción, y si bien no es una función necesaria para la supervivencia del individuo, sí lo es para la supervivencia de la especie, constituyendo por lo tanto una característica crucial, si no la más definitoria de la materia viva.

En los organismos unicelulares y coloniales mas simples, esta reproducción consiste únicamente en la división celular. Sin embargo, en organismos pluricelulares más complejos la reproducción requiere de la mezcla de los materiales genéticos de dos progenitores para generar un individuo combinación de ambos. Esto se produce mediante la fusión de una célula sexual o gameto de cada uno de ellos, generando una célula huevo o cigoto, que debe sufrir todo un proceso ontogénico hasta alcanzar la forma adulta fértil y poder reproducirse de nuevo, perpetuando así el ciclo vital. Todo los procesos ocurridos durante ese tiempo son el objeto de estudio de la Biología del Desarrollo.

El estudio del proceso ontogénico ha revelado recientemente que la asombrosa variedad de planes morfológicos y de crecimiento presentes en los seres vivos están controlados por mecanismos altamente conservados en la mayor parte de los organismos (Lawrence, 1992;

Gehart,1997; Holland, 1999; Raff, 2000). No constituyen, además, un repertorio tan extenso como se pensó en un principio; más bien conforman una lista limitada de recursos que se utilizan repetidamente durante el desarrollo. Esto abre un nuevo campo de estudio dentro de la Biología del Desarrollo: la biología evolutiva o Evo-Devo, que intenta establecer las líneas filogenéticas y evolutivas de los seres vivos a partir del estudio comparado de su desarrollo.

En La Biología del Desarrollo se utilizan diversos sistemas modelo, tanto de vertebrados como de invertebrados. Varios se eligieron hace ya muchas décadas, por lo cual ahora disponemos de mucha información sobre ellos y de un gran número de herramientas, tanto genéticas como moleculares. Tal vez el ejemplo más paradigmático sea la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, aunque también son importantes otros organismos como *Caenorhabditis elegans* (nematodo), *Xenopus laevis* (rana), *Danio rario* (pez cebra) y *Mus musculus* (ratón).

Drosophila melanogaster.

En nuestro trabajo utilizamos como sistema modelo *Drosophila melanogaster*, la mosca del vinagre. El estudio de este díptero comenzó a principios del siglo XX, de manos del entomólogo Johann Wilhem Meigen, considerado el padre de la dipterología. Más tarde, Joseph Albert Lintner escribió el primer artículo sobre esta especie (Fig. I1). Desde entonces, *Drosophila* ha sido empleada intensiva y extensivamente como modelo experimental por genetistas y biólogos en general por lo ventajoso de su cría en cautividad, puesto que es barata, apenas requiere cuidados, posee un rápido ciclo vital (9 días) (Fig. I2), y un pequeño tamaño (3 mm en su eje más largo), que permite almacenar gran cantidad de individuos en un espacio pequeño. Además, posee una genética sencilla (sólo tiene cuatro pares de cromosomas), poco DNA repetido y existen muchas cepas con mutaciones y alteraciones del DNA pre-existentes a la era genómica. La existencia de cromosomas balanceadores (en los cuales la recombinación está impedida), permite mantener indefinidamente estas alteraciones cromosómicas. *Drosophila* fue también uno de los primeros organismos pluricelulares cuyo DNA fue completamente secuenciado (Adams et al., 2000). Aparte de todo esto, durante los últimos años, se han desarrollado diversas herramientas moleculares específicas de *Drosophila* que nos permiten controlar espacial y temporalmente los patrones de expresión de los genes, lo cual facilita el estudio de las relaciones genéticas existentes durante la morfogénesis y los procesos morfológicos en los que están implicados.

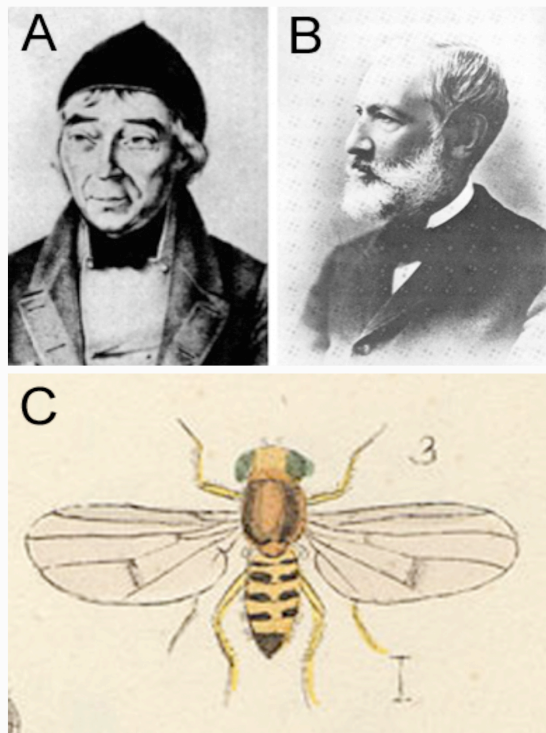


Figura 11. Los entomólogos que describieron *Drosophila melanogaster*.

(A) Johann Wilhelm Meigen (1764–1845) describió un vasto número de dípteros durante el siglo XIX. En 1830 describió *Drosophila* en "Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten" con una breve definición: "Cabeza, tórax y patas amarillos; abdomen negro. Los halterios son blancos, las alas incoloras" (B) Joseph Albert Lintner (1822–1898) fue el primero en hacer un informe completo sobre la especie, a la que denominó *Drosophila ampelophila*, en 1875 (Archivo del New York State Museum, Albany, NY, USA) (C) Ilustración de un ejemplar de *Drosophila melanogaster* según aparece en la obra de Meigen (Meigen, 1830).

Drosophila melanogaster posee un plan de desarrollo holometábolo (con metamorfosis completa) dividido en tres fases (Fig. 12): la embriogénesis, que termina con la eclosión del huevo, el periodo larvario (subdividido a su vez en 3 estadios separados por mudas), y el periodo pupal (durante el que se produce la metamorfosis), tras el cual tiene lugar la eclosión de un adulto o imago completamente diferente a la larva y con un tamaño definitivo (Fig.12).

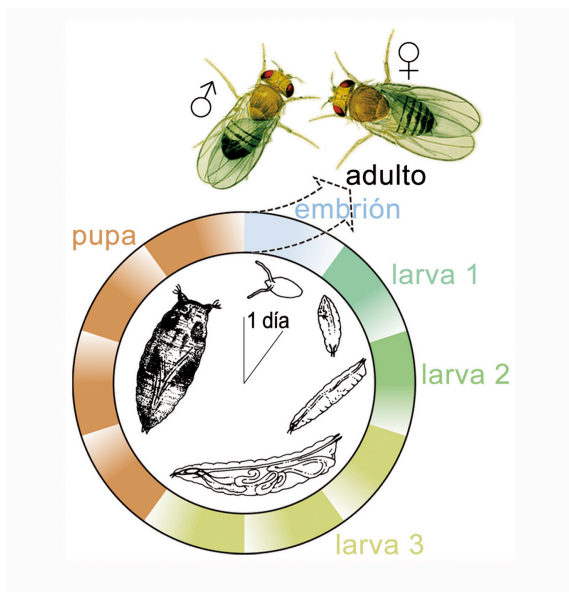


Figura 12. Ciclo vital de *Drosophila*

El ciclo vital de *Drosophila melanogaster* dura unos 10 días desde la deposición del huevo hasta la eclosión del adulto (Cedida por J. Navascués).

La información posicional en el desarrollo. La definición del eje antero-posterior en *Drosophila*

Tal vez el primero de los procesos que deba acometer un cigoto para desarrollarse en un individuo larvario o adulto sea el de la generación de las coordenadas espaciales básicas, tales como la definición del polo anterior y posterior, o de la zona dorsal frente a la ventral. A este respecto, *Drosophila* se ha erigido como uno de los modelos más estudiados a raíz de los trabajos dedicados a describir el establecimiento del eje antero-posterior (A/P) en el embrión (Nüsslein-Volhard y Wieschaus 1980; Frohnhofer et al., 1986) (Fig. I3). Según este modelo, la polaridad inicial del embrión vendría dada por la localización precisa de RNAs maternos, los cuales, así como las proteínas que codifican, se distribuyen en gradientes opuestos desde ambos extremos del

embrión, definiendo por primera vez su eje anteroposterior (Fig. I3). Las concentraciones de estas proteínas varían a lo largo de dicho eje, y desencadenan la activación diferencial de los genes zigóticos “gap” (de “vanos”) y los genes “pair rule” (de “regla par”) en bandas definidas a lo largo del eje A/P del embrión (Fig. I3). Aunque la expresión de estos grupos de genes es transitoria y desaparece poco después de su activación, sus zonas de expresión delimitan las de los genes de polaridad segmental y las de los genes Hox. Estos dos últimos conjuntos de genes sí se expresarán durante toda la vida del individuo, manteniendo la información posicional relativa en el eje anteroposterior (Figs. I3, I4A).

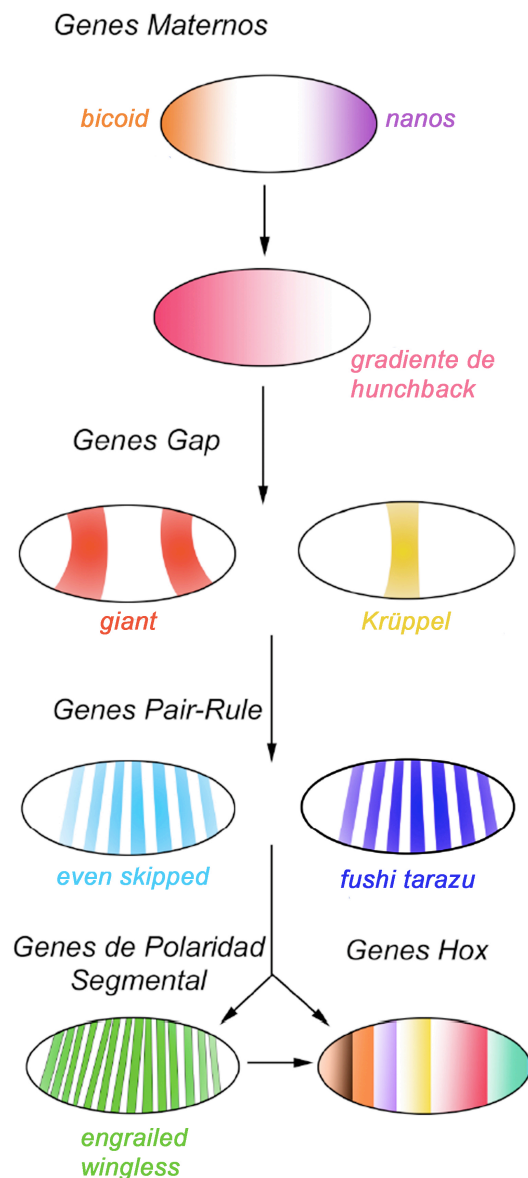


Figura I3. Cascada de regulación génica implicada en la generación del eje anteroposterior en el embrión temprano de *Drosophila*.

Las proteínas codificadas por RNAs maternos, como Hunchback, activan la expresión de los genes zigóticos *gap*, como *giant* y *Krüppel*, y *pair Rule* como *even-skipped* y *fushi tarazu*. Éstos, a su vez, activan a los genes de la polaridad segmental y todos ellos a los genes Hox, que tienen patrones discretos a lo largo del eje anteroposterior (Modificado de Alberts y cols., 2002).

Añadimos una nota para indicar que las unidades básicas metaméricas son los parasegmentos (PS), conformados por la parte posterior de un segmento y la parte anterior del siguiente (Martínez-Arias y Lawrence, 1985). Aunque aparentemente al estudiar el insecto parezca evidente que la división del cuerpo es en segmentos (y de hecho hemos reseñado así la anatomía general), funcionalmente se verifica que son los parasegmentos las unidades monoméricas de funcionalidad genética en las que está dividida la mosca. De esta forma, los bordes de expresión de los genes Hox se ajustan en gran número de casos no a los segmentos, sino a los parasegmentos, y de igual forma lo hacen muchos genes importantes en el desarrollo embrionario (Ingham et al., 1985; Martínez-Arias y Lawrence, 1985); así pues, lo correcto es hablar en términos parasegmentales, aunque por simplificar la discusión de las ideas en el texto nos referiremos muchas veces a los segmentos.

Los genes Hox

Los genes Hox son un grupo de genes responsables de la especificación del eje antero-posterior en todos los animales con simetría bilateral estudiados hasta hoy e incluso algunos grupos de animales no bilaterales con eje A/P (Fig. 14A) (Finnerty, 2003). Reciben su nombre a causa de las mutaciones que producen. En un rango de animales que va desde los nemátodos hasta el ratón, las mutaciones en este grupo de genes producen defectos en regiones discretas a lo largo del eje A/P del animal. Estos defectos son a veces muy notables, pues transforman por completo una región del cuerpo en otra, incluyendo todas sus características: tamaño, patrón, presencia de apéndices, etc. Estas mutaciones fueron denominadas homeóticas (a partir del término homeosis), por William Bateson (Bateson, 1894).

No obstante, hay otro tipo de mutaciones homeóticas que no tiene que ver con transformaciones en el patrón anteroposterior, sino que modifican o eliminan una estructura sin transformarla en otra homóloga. Por ejemplo la ausencia de los genes *Hoxa/Hoxd* en ratón elimina la formación de las extremidades distales (Kmita et al., 2005), así como la de *Abdominal-B (Abd-B)* en *Drosophila* elimina los espiráculos posteriores en el embrión. Este tipo de fenotipos muestra que los genes Hox también tienen también importantes funciones morfogénicas (Hombría y Lovegrove, 2003) aparte de aquellas encaminadas únicamente a adquisición de la identidad segmental.

Los genes Hox presentan, al menos en *Drosophila*, algunas particularidades destacables, como son: a) la presencia de un homeodominio, b) el agrupamiento en complejos génicos c) la colinearidad, d) su regulación transcripcional jerárquica y e) la supresión fenotípica.

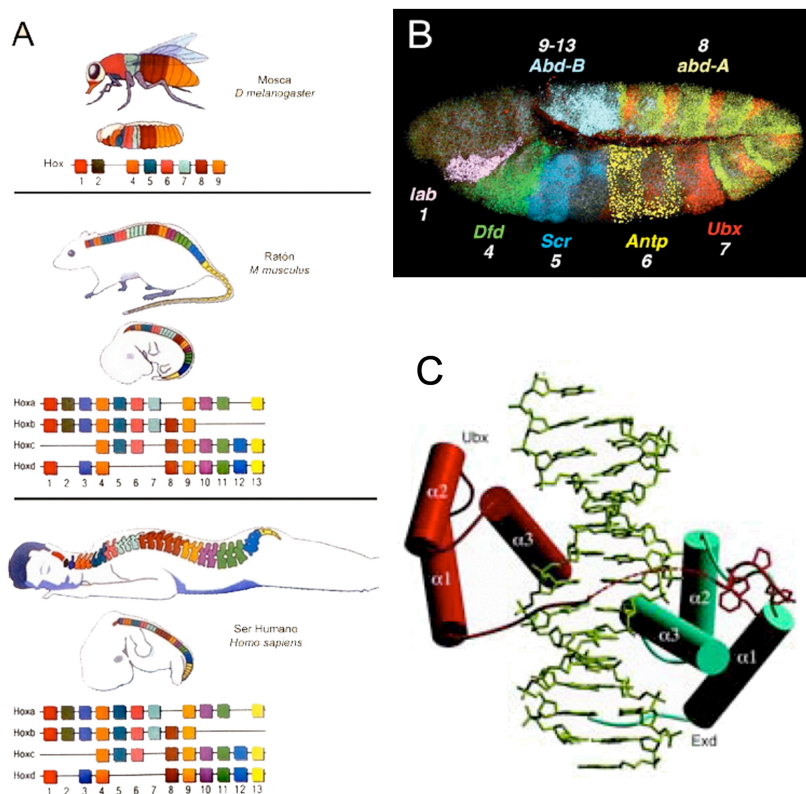


Figura 14. Los genes Hox.

(A) Esquema de los genes que conforman los complejos Hox en *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*, así como su patrón de expresión en el eje anteroposterior del animal. Se representan con el mismo color los genes que son homólogos en cada especie y entre ellas (en este caso, ortólogos). Se observa cómo el orden relativo de los genes dentro de los complejos coincide con el orden relativo de sus expresiones en el eje corporal, y también cómo este orden se ha conservado filogenéticamente (tomado de: http://evonet.sdsc.edu/evoscisociety/homeobox_genes.htm) (B) Embrión de *Drosophila* con hibridación in situ simultánea de siete sondas contra los genes Hox indicados, mostrando dicho orden. En blanco se señalan los números de sus ortólogos de vertebrados, como en (A). (C) Representación de la estructura tridimensional de la interacción entre el homeodominio de *Ubx* (en rojo) con la doble hebra de ADN y el cofactor *Exd* (en verde).

a) Presencia de homeodominio: Funcionalmente, las proteínas homeóticas son factores de transcripción que se unen al ADN a través de un dominio altamente conservado que se denomina homeodominio (Fig. 14C), el cual está presente también en otras proteínas. Se trata de una secuencia de sesenta aminoácidos codificada por una secuencia de 180 pares de bases llamada homeobox (McGinnis et al., 1984; Scott y Weiner, 1984). Su estructura es del tipo hélice-giro-hélice (Kissinger et al., 1990)(Fig. 14C). El grado de identidad entre los homeodominios de las distintas proteínas Hox es muy elevado, pero lo es más aún cuando los comparamos con los de sus correspondientes ortólogos de otras especies, incluso cuando comparamos vertebrados e invertebrados (Krumlauf, 1994; Figura 14A). Mediante su interacción con el ADN a través del homeodominio, las proteínas homeóticas pueden activar o reprimir la expresión un gran número de genes, implicados en casi la totalidad de los procesos que tienen lugar durante el desarrollo, tales como la proliferación celular, muerte celular, diferenciación celular, etc. La actividad de genes Hox ocurre por tanto de una manera específica en cada segmento, generando las estructuras, formas y tamaños correspondientes a la posición de ese segmento a lo largo del eje A/P.

b) Agrupamiento en “complejo génicos”: Los genes Hox en *Drosophila melanogaster* se agrupan en dos complejos génicos, el Complejo Antennapedia (ANT-C), que incluye, por orden en el cromosoma y de proximal a distal, los genes *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex*

combs reduced (*Scr*) y *Antennapedia* (*Antp*), y el Complejo Bithorax (BX-C), que incluye a *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*) (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985; Kaufman et al., 1990) (Fig. 14A). En otras especies de invertebrados también los genes ortólogos correspondientes se hallan agrupados en complejos o en uno sólo y en el mismo orden (Fig. 14A). En vertebrados sucede algo parecido, pues también los genes Hox están agrupados, formando un único complejo que está repetido hasta un total de cuatro copias en el ratón o en el hombre (Krumlauf, 1994; Fig. 19A) o siete copias en los peces teleósteos (Amores et al., 1989). De manera excepcional, en algunos organismos se han dado procesos de desintegración de los complejos, como en el caso del urocordado *Ciona intestinalis* (Ikuta et al., 2004).

c) Colinearidad: Más sorprendente aún que el agrupamiento de genes Hox es cómo en *Drosophila* este orden de los genes Hox en el cromosoma se corresponde con el orden en que se hallan sus dominios funcionales en el eje A/P del animal; es decir, los genes que dentro de cada complejo se encuentran en posiciones más proximales se expresan en estructuras corporales más anteriores y los más distales, en estructuras más posteriores (Lewis, 1978; Tschopp y Duboule, 2011) (Fig. 14A, B). A este fenómeno de correlación entre la posición relativa de los genes Hox y la posición relativa de sus dominios de expresión se le llama colinearidad (Lewis, 1978; Tschopp y Duboule, 2011), y de nuevo es extensivo a prácticamente todos los metazoos (Duboule y Dollé, 1989; Graham et al., 1989) (Fig. 14A, B). Además de esta colinearidad espacial, también hay una colinearidad temporal, descrita en vertebrados (Dollé et al., 1989; Duboule, 1994; Tschopp y Duboule, 2011), según la cual los genes situados en una posición más proximal no sólo se expresan en una región más anterior del cuerpo, sino que su activación precede a las de otros genes más distales, y el orden secuencial de activación de los Hox es el mismo que el orden en el que se encuentran en el Complejo.

d) Jerarquía transcripcional: Los genes Hox parecen regularse mutuamente de diversas maneras, afectando a su dominio y momento de expresión y también a la forma en que funcionan conjuntamente. Así, en primera instancia, hay un nivel de regulación directa a nivel transcripcional, en el que unos genes Hox son capaces de reprimir la transcripción de otros. Aunque entre algunos Hox del complejo Antennapedia no está tan claro como en el Complejo Bithorax, la regla general es que cada Hox es regulado transcripcionalmente por todos los demás Hox cuyos patrones de expresión son más posteriores al suyo en el eje A/P (y, como hemos dicho, cuyos loci son más distales en el cromosoma); y a su vez, este Hox es capaz de regular a los que tienen un patrón de expresión más anterior y por tanto una posición cromosómica más proximal (Hafen et al., 1984; Struhl y White, 1985).

e) Un segundo nivel de regulación mutua es el que viene dado por lo que se denomina supresión fenotípica. Ésta se refiere al hecho de que los productos de genes Hox más posteriores siguen haciendo prevalecer su función sobre otros de expresión más anterior aún cuando los genes que los codifican no estén transcripcionalmente inactivados (González-Reyes y Morata, 1990; González-Reyes et al., 1990; Duboule, 1991; Duboule y Morata, 1994; Noro et al., 2011).

La mayoría de las proteínas Hox se unen a secuencias de DNA con afinidad similar en experimentos *in vitro* (Hoey y Levine, 1988; Ekker *et al.*, 1994). La especificidad *in vivo* depende por lo tanto de cofactores. Hasta el momento se ha descrito en *Drosophila* la existencia de dos de estos genes: *extradenticle* (*exd*) (Peifer y Wieschaus, 1990; Mann y Chan, 1996), homólogo del grupo PBC en vertebrados (Moens y Selleri, 2006), y *homothorax* (*hth*), homólogo al grupo de los Meis en vertebrados, y ambos pertenecen a la familia de proteínas TALE (Bürglin, 1997; Berthelsen *et al.*, 1998).

Exd se une tanto a las proteínas Hox como al DNA aumentando la especificidad de proteínas como Ubx o Abd-A (Chan *et al.*, 1994; van Dijk y Murre, 1994). Por otro lado, la falta de función de *exd* produce fenotipos homeóticos, alterando la identidad de los segmentos corporales sin afectar a la expresión de los genes Hox (Peifer y Wieschaus, 1990; Rauskolb *et al.*, 1993; González-Crespo y Morata, 1995; Rauskolb *et al.*, 1995). En la unión Exd-Hox parece importante un dominio conservado en estos últimos, consistente en una secuencia de cuatro a seis aminoácidos que recibe el nombre de Hexapéptido (HX) o dominio Tyr-Pro-Trp-Met (YPWM) (Johnson *et al.*, 1995; Mann y Chan, 1996), en el extremo N-terminal de las proteínas homeóticas. Sin embargo, estudios recientes muestran cómo proteínas como Ubx y abd-A son capaces de asociarse con Exd y activar targets específicos incluso en ausencia del HX, poniendo de manifiesto la existencia de otros dominios de interacción entre Exd y Ubx y Abd-A (Chan *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1995; Galant *et al.*, 2002; Merabet *et al.*, 2003; Tour *et al.*, 2005). La especificidad en estas proteínas parece depender de otro dominio, esta vez en el extremo C-terminal de la proteína, llamado dominio UbdA. No obstante, la especificidad de cada proteína Hox varía en cada tejido, y dependiendo del gen diana estudiado, la implicación de unos dominios u otros varía considerablemente. La interacción entre los genes Hox y Exd es por tanto compleja y aún hoy no está del todo bien entendida.

homothorax es otro cofactor de las proteínas Hox. Codifica una proteína también con homeodominio que es responsable de la localización nuclear de Exd. En ausencia de Hth, Exd se encuentra en el citoplasma celular, donde no puede desempeñar su función como cofactor de las proteínas Hox (Mann y Abu-Shaar, 1996; Aspland y White, 1997; Rieckhof *et al.*, 1997; Kurant *et al.*, 1998; Pai *et al.*, 1998). También se ha propuesto que Hth pueda estar participando directamente en algunas de las uniones de los Hox al DNA, formando trímeros Hox/Exd/Hth (Ryoo *et al.*, 1999).

Regulación de los genes Hox: los genes *Polycomb* y *Trithorax*.

Como hemos descrito anteriormente, el establecimiento de los dominios de expresión de los genes Hox depende tempranamente de los genes “pair-rule” y de los genes de polaridad

segmental, y también de la regulación de la transcripción entre distintos genes Hox. Sin embargo, los genes de segmentación sólo se expresan durante las cuatro primeras horas del desarrollo (Jackle et al., 1992) mientras que los genes homeóticos se expresan y se requieren funcionalmente a lo largo de todo el desarrollo. Han de existir por tanto otros mecanismos implicados en el mantenimiento de su activación e inactivación. Aquí entran en funcionamiento los genes del grupo *Polycomb* (*PcG*) y los genes del grupo *trithorax* (*trxG*). Los genes *PcG* son requeridos para el mantenimiento del estado transcripcional reprimido de los genes Hox (Lewis, 1978; Jurgens, 1985; Beisel y Paro, 2011), mientras que los *trxG* están implicados en mantener el estado transcripcional activo (Kennison y Tamkun, 1988; Schuettengruber et al., 2011). Consecuentemente con esta función, moscas con mutaciones en genes del grupo *PcG* desarrollan transformaciones de estructuras anteriores en posteriores, similares a mutaciones de ganancia de función de los genes Hox (Lewis, 1978; Soshnikova and Duboule, 2009) mientras que las mutaciones en los genes *trxG* producen fenotipos parecidos a los producidos por la falta de función de varios genes del ANT-C y BX-C (Capdevila y Garcia-Bellido, 1974; Castelli-Gair y Garcia-Bellido, 1990; Ingham, 1998; Soshnikova y Duboule, 2009).

Los genes de los grupos *Pc* y *trx* codifican proteínas nucleares asociadas a cromatina que parecen tener una expresión ubicua en el embrión y en los discos imaginales. Actúan como señales de memoria, marcando de célula a célula el estado de activación de la cromatina mediante cambios en su configuración, que la hacen legible o no por la maquinaria transcripcional. De esta forma, se transmite el estado de activación o represión del grupo de genes Hox de las células parentales a las hijas (Kennison, 1995; Pirrotta, 1995; Schuettengruber et al., 2007; Beisel y Paro, 2011). Además, se ha demostrado que los genes *PcG* son, en su mayoría, requeridos más allá de la embriogénesis, durante el resto del desarrollo para el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos (Busturia y Morata, 1988; Duncan, 1982).

La familia *PcG* engloba un conjunto de proteínas heterogéneas. Poseen dominios de secuencias conservadas encontradas en otras proteínas de unión a cromatina como, por ejemplo, cromodominios y bromodominios, además de otros dominios que permiten la interacción proteína-proteína, como Zinc-finger y Ring-finger (Simon, 2003). Forman, por tanto, complejos multiméricos que actúan regulando la expresión de los genes diana. Se ha descrito la existencia de varios complejos, estando especialmente estudiados PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) (Francis et al., 2001) y PRC2 (Ng et al., 2000).

Las proteínas *PcG* y *trxG* interactúan con el DNA en regiones del mismo que reciben el nombre de Elementos de Respuesta a Polycomb (PREs) y Elementos de Respuesta a trithorax (TREs) respectivamente. Los PREs son secuencias de ADN de unas 100-300 pb que pueden estar cerca o lejos de los promotores, y señalizan los genes específicos sobre los que las proteínas *Pc* deben actuar (Chiang et al., 1995; Horard et al., 2000; Mishra et al., 2001) (Fig. I5). Loci complejos como los homeóticos, están regulados por distintos PREs y TREs. En muchos casos las secuencias de los PREs solapan con las de los TREs (Tillib, et al., 1999), lo que implica que en numerosas ocasiones las proteínas *PcG* y *trxG* compartan sitios de interacción (Orlando et al., 1998; Strutt et al., 1997; Tillib, et al., 1999).

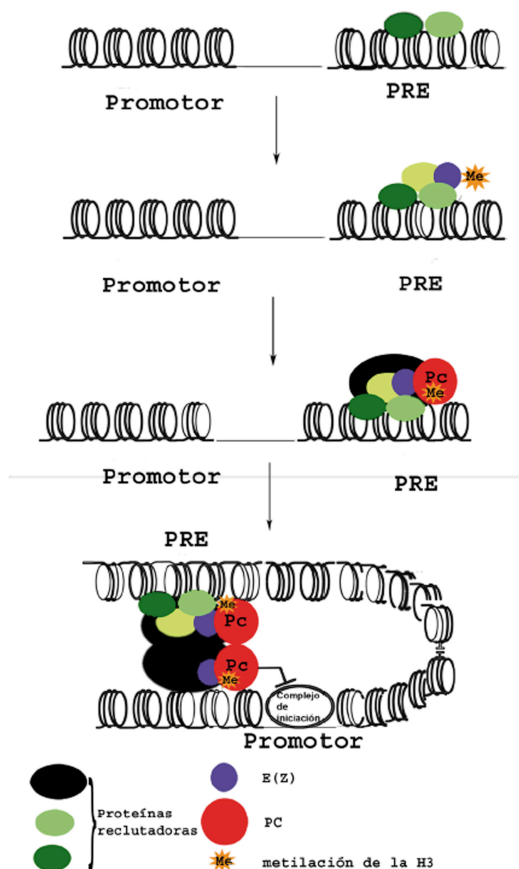


Figura 15. Mecanismo de acción de genes PcG

Mecanismo de mantenimiento de la expresión génica mediado por las proteínas PcG/trxG: reclutamiento de los complejos PcG al DNA. Las proteínas reclutadoras como Pho y Phol, entre otras, se unen al PRE y reclutarían al complejo PRC2 que contiene E(z). E(z) metila la lisina 27 de la histona 3 (H3K27), lo que facilita el reclutamiento del complejo PRC1 por la interacción del cromodominio de la proteína Pc. Por un mecanismo desconocido se formaría un "loop" entre el promotor y el PRE, estabilizado por la dimerización de Pc, lo que facilitaría que E(z) siguiera metilando toda la región haciéndola inaccesible a la transcripción.

A pesar de los múltiples estudios realizados, aún se desconoce cómo las proteínas PcG o trxG son reclutadas a los PREs. El modelo más simple postula que una de estas proteínas con capacidad de interactuar con el ADN se une directamente con la secuencia del PRE,

siendo de este modo, el responsable de la interacción con el resto de las proteínas PcG y trxG (Fig. 15). Las propiedades de auto-agregación de las proteínas PcG pueden contribuir al reclutamiento, estando sólo una pequeña fracción del complejo en contacto con los factores reclutadores. La mayor parte de las proteínas PcG y trxG están asociadas a la cromatina y, además, se expresan ubicuamente, por lo que deberá existir un mecanismo mediante el cual estas proteínas restablezcan, tras la división celular, la asociación con los genes diana sólo en las células correctas. Se han propuesto tres posibles mecanismos del mantenimiento de la represión transcripcional mediada por PcG (Beisel y Paro, 2011). En el primero, las proteínas PcG actúan como represores mediante la generación de una estructura de la cromatina altamente compactada, de forma que se hace inaccesible a los factores activadores de la transcripción y a la maquinaria de transcripción basal. En el segundo, las proteínas PcG interaccionan directamente con la maquinaria de transcripción e inhiben su función. Por último, también se ha demostrado que las proteínas PcG podrían reclutar los genes que han de permanecer silenciados a unos dominios nucleares específicos en los que se localizan las proteínas PcG (Lanzuolo et al., 2007). Existen evidencias experimentales para apoyar los tres modelos mecanísticos que, en un principio, no son excluyentes.

***Ultrabithorax*.**

El gen *Ultrabithorax* (*Ubx*) es un gen perteneciente al BX-C y responsable del desarrollo de la región formada por los parasgmentos 5 y 6 (o lo que es lo mismo, desde el compartimento posterior del segundo segmento torácico (T2p) al compartimento anterior del primer segmento abdominal (A1a), ambos inclusive (Lewis, 1963; Morata y Kerridge, 1981; Hayes et al., 1984; Akam y Martinez-Arias, 1985; Beachy et al., 1985; White y Wilcox, 1985). Mutaciones en este gen provocan típicamente transformaciones homeóticas de T3 en T2 (Lewis, 1963), generando moscas con una duplicación del tórax mesotorácico adulto y consecuentemente dos pares de alas (Fig. I6A, comparar con fenotipo silvestre en B). De manera inversa, la ganancia de función en las alas genera transformaciones de estas en halterios (Lewis, 1978) (Fig. I6C, comparar con fenotipo silvestre en B), confirmando que *Ubx* es necesario y suficiente para dirigir el crecimiento y diferenciación del T3 de una manera diferente a la del T2.

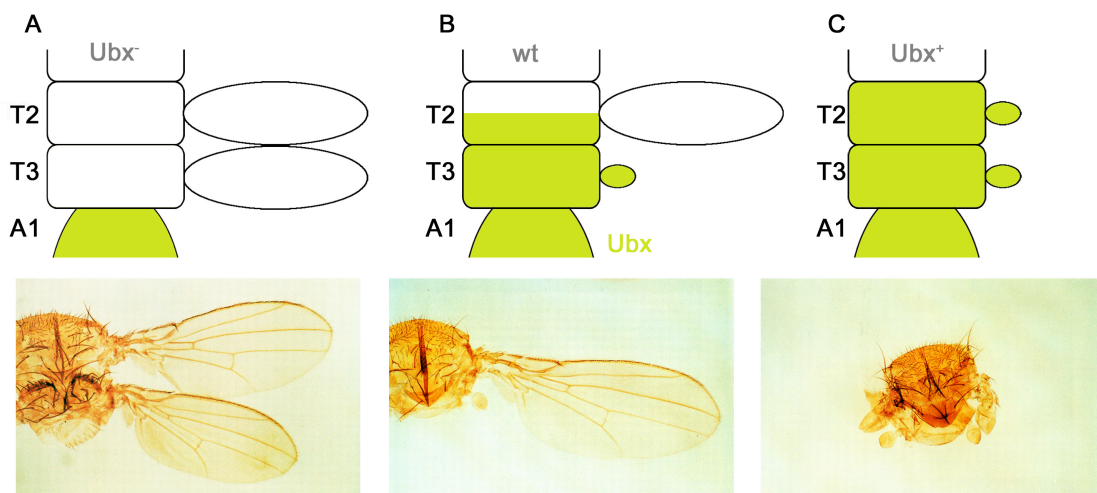


Figura I6. Expresión y función de *Ultrabithorax*

Esquema de los dominios de expresión de *Ubx* en el tórax de individuos silvestres (B) y en mutantes de ganancia (C) y pérdida de función (A), y sus consecuencias morfológicas en el tórax de *Drosophila*. La falta de función (izquierda) produce moscas con cuatro alas (A) mientras que la expresión ectópica de este gen origina adultos de cuatro halterios (C).

Ubx cubre una región genómica de 76 kb y sus DNAC tienen una longitud de entre 3.2 y 4.6 kb dependiendo del procesamiento de los RNAs. De los cuatro exones que componen la región codificante de *Ubx* hay dos comunes a todos los DNAC (los exones 5' de 741 pb y 3' de 297 pb) y dos microexones de 51 pb que son los que sufren un "splicing" o procesamiento diferencial (Fig. I7A). Además, el exón 5' presenta dos puntos alternativos de donación de "splicing" separados por 27 pb (Fig. 7A). La traducción de esos DNAC lleva a la síntesis de seis isoformas distintas de *Ubx* (Fig. I7A) (O'Connor et al., 1988; Kornfeld et al., 1989; Lopez y Hogness, 1991), las cuales presentan en el embrión una cierta especificidad tisular en su expresión (Lopez y Hogness, 1991; Artero et al., 1992).

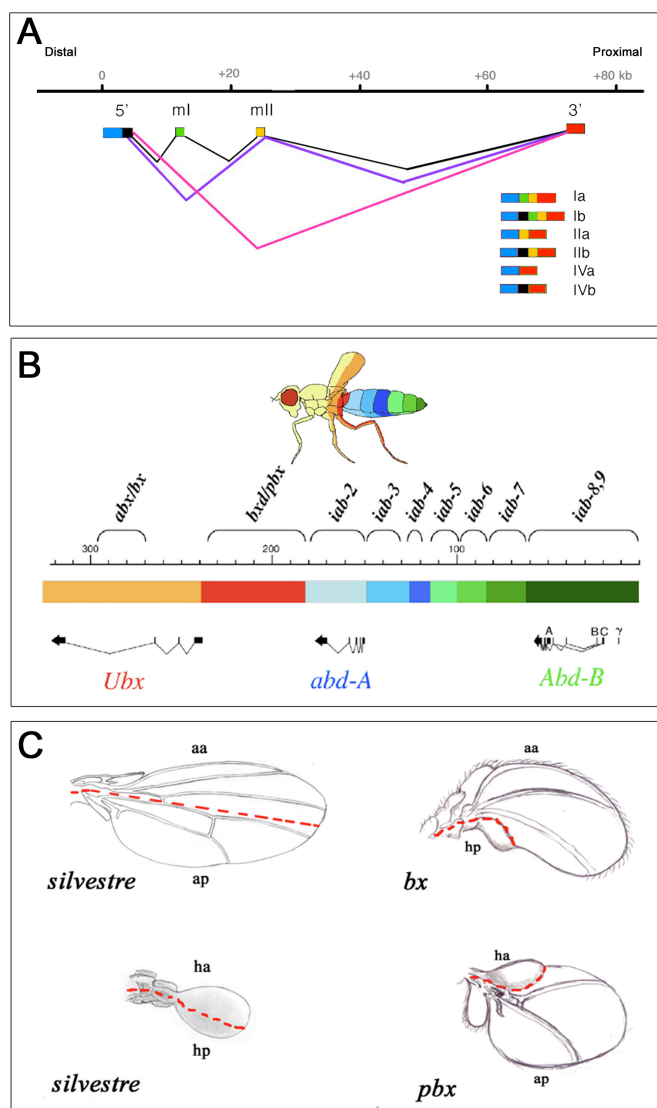


Figura 17. Esquemas de las regiones génicas de *Ultrabithorax*, el C-BX y de fenotipos de mutaciones en las regiones reguladoras de *Ultrabithorax*. (A) Esquema de la región codificante de *Ubx* donde se señala los distintos modos de "splicing" posibles entre los distintos exones, y la representación esquemática de las diferentes isoformas de *Ubx*. (ml=microexón 1, mll=microexón 2) (Modificado de de Navas et al. 2011). (B) El Complejo Bithorax de *Drosophila*. Se representan sus tres genes en tres colores distintos y los elementos reguladores con diferentes intensidades. Regiones reguladoras de *Ubx*: *abx/bx* (naranja) y *pbx/bxd* (rojo) (Tomado de Maeda y Karch, 2006) Nótese que la orientación de los genes en los paneles A y B es opuesta. (C) Esquema de transformaciones *bx* y *pbx*. Los mutantes *bx* tienen el compartimento anterior transformado en ala y los mutantes *pbx* el posterior. La línea roja discontinua señala la división entre el compartimento anterior y posterior en todos los casos. aa= ala anterior, ap= ala posterior, ha=halterio anterior y hp= halterio posterior.

Las secuencias reguladoras de *Ubx*, sin embargo, se expanden a lo largo de una región de 150 kb aproximadamente, dentro de las cuales se encuentra la secuencia codificante para la proteína homeótica (Fig. 17B). Estas regiones reguladoras fueron descubiertas a raíz de

los fenotipos que producían en las moscas adultas (Fig. 17C), antes incluso de que se determinase la existencia de *Ubx* como uno de los únicos tres genes homeóticos integrantes del Complejo Bithorax (Lewis, 1963; 1978). Estas mutaciones en las secuencias reguladoras de *Ubx* pueden agruparse en dos clases, y demuestran la naturaleza parasegmental del control de la expresión del gen. Las mutaciones *anterobithorax* y *bithorax* (*abx/bx*) engloban aquellas lesiones producidas en la región más "downstream" de *Ubx*, generalmente dentro del tercer intrón, y provocan fenotipos de transformación del compartimento posterior del segundo segmento torácico (excepto el ala) en el correspondiente del primer segmento del tórax y del compartimento anterior del tercer segmento torácico en el correspondiente del segundo segmento (incluyendo las del halterio anterior en el compartimento anterior de ala), indicando que son responsables de la expresión de *Ubx* en parte del T2p y en el T3a, que corresponden al parasegmento 5 (Fig. 17C). Por el contrario, las mutaciones en regiones más "upstream" del gen reciben el nombre de *postbithorax* y

bithoraxoid (*pbx/bxd*), y dan lugar a transformaciones de T3p en T2p y A1a en T3a, siendo por lo tanto responsables de la expresión y función de *Ubx* en dichos compartimentos, que corresponden al parasegmento 6 (Fig. I7C) (Lewis, 1963; Garcia-Bellido et al., 1976; Morata y Kerridge, 1981; Miñana y Garcia-Bellido, 1982; Bender et al., 1985; Hayes et al., 1984; Casanova et al., 1985; Peifer y Bender, 1986; Beachy et al., 1985).

Ubx es un factor de transcripción y por lo tanto su función es la de controlar la expresión de distintos genes subsidiarios. Se ha comprobado que *Ubx* es capaz de controlar en los discos imaginales la actividad de distintas vías de señalización a diversos niveles. De este modo, aunque el disco de halterio y el disco de ala (que formarán los halterios y las alas, respectivamente) comparten vías de señalización que controlan su patrón y crecimiento, la presencia de *Ubx* hace que la respuesta a estas vías sea distinta (Weatherbee et al., 1998; Shashidhara et al., 1999; Prasad et al., 2003; Mohit et al., 2006; de Navas et al., 2006; Crickmore y Mann, 2006; Makhijani et al., 2007).

En *Ubx* han sido descritos dos mecanismos de autorregulación, uno de autorregulación positiva en las células del mesodermo visceral (Bienz y Tremml, 1988) y otro de autorregulación negativa en las células de origen ectodérmico (Irvine et al., 1993). Este último muestra cómo tanto en el ectodermo del embrión como en los discos imaginales, niveles de *Ubx* superiores a los normales son capaces de disminuir la actividad del gen, se supone para conseguir devolver los niveles de proteína a los necesarios para un desarrollo correcto de los tejidos (Irvine et al., 1993). El estudio de este mecanismo de autoregulación se describe en la primera parte de la Tesis.

Los discos imaginales

Como hemos indicado anteriormente, el desarrollo de un individuo requiere de la coordinación de multitud de procesos, que podrían agruparse en dos clases generales: aquellos destinados al establecimiento del patrón, y aquellos responsables de conseguir un tamaño adecuado de cada una de sus partes o estructuras. Posiblemente el modelo más empleado en el estudio del crecimiento y del patrón sea el disco imaginal del ala de *Drosophila*.

Los discos imaginales son estructuras epiteliales en forma de saco que se encuentran adheridas a la cara interna de la pared larvaria y forman, tras la metamorfosis, el exoesqueleto de *Drosophila*. En la larva hay veintiún discos imaginales: dos series contralaterales que dan lugar a la epidermis de la cabeza y el tórax, y otro disco con simetría bilateral para la genitalia (Fig. I8). El tórax, que contiene tres pares de apéndices ventrales (las patas) y dos pares de apéndices dorsales (las alas y los halterios), está formado por doce discos: tres pares de discos de pata (uno por extremidad inferior), un par de discos protorácicos (que dan lugar al protórax dorsal), un par de discos de ala y otro par de halterio.

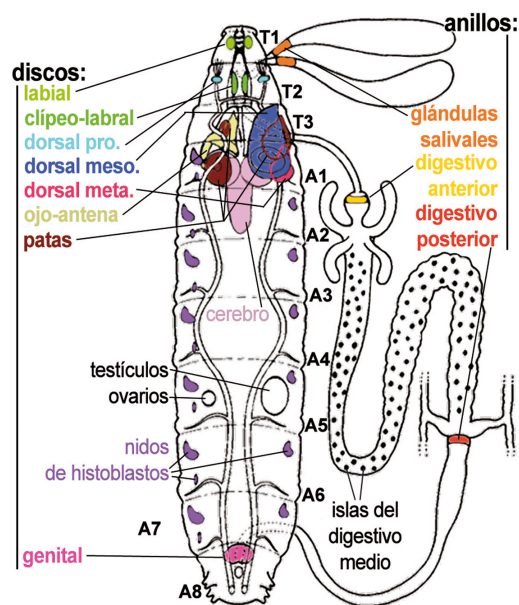


Figura 18. Estructuras imaginales en la larva. Los discos dorsales pro-, meso- y metatorácicos corresponden a los de húmero, ala y halterio. Hay tres nidos de histoblastos por cada hemisegmento: los dorsales anterior y posterior (representados en el lado izquierdo) y el ventral (lado derecho). Los discos de la pata protorácica y la mesotorácica se representan en el lado izquierdo, anterior y posterior respectivamente, y el de pata metatorácica está en el lado derecho. Modificado de Bryant y Levinson (1985).

Los primordios de los discos imaginales se especifican durante la embriogénesis por la expresión de genes específicos de tejido imaginal (Cohen et al., 1993). En *Drosophila* y otras especies holometábolos, los discos

imaginales crecen profusamente desde el comienzo del periodo larvario y aparecen como una invaginación discernible histológicamente del epitelio larvario (Švácha, 1992). La epidermis del abdomen, en cambio, proviene de los nidos de histoblastos, que tienen un plan de desarrollo más parecido al de los discos del holometábolo ancestral, manteniéndose quiescentes hasta la pupación, momento en el que sus células proliferan profusamente (García-Bellido y Merriam, 1971a; Guerra et al., 1973; Madhavan y Schneiderman, 1977; Madhavan y Madhavan, 1980).

Subdivisión genética del disco de ala. Compartimentos.

Los discos imaginales forman estructuras adultas. Dentro de cada disco, al igual que ocurre con el resto del segmento, existen subdivisiones de linaje celular denominadas compartimentos (García-Bellido et al., 1973; 1976). Estos compartimentos se definen por la expresión de una serie de genes selectores, que funcionan como una señal binaria de encendido o apagado (García-Bellido, 1975; revisado en Mann y Morata, 2000). Una vez iniciada la actividad de cada gen selector, el linaje de cada célula será el mismo durante el resto del desarrollo, y todas las células que expresen un mismo gen selector quedarán circunscritas a una región concreta del tejido, sin mezclarse con aquellas que no lo expresen, formando así dos compartimentos, o grupos inmiscibles de células con linaje diferente.

El disco imaginal de ala tiene varios compartimentos. La primera subdivisión compartimental ocurre durante el desarrollo embrionario y es previa a la formación de los discos imaginales. Se trata de la formación de los compartimentos anterior (A) y posterior (P) en todos y cada uno de los segmentos (Fig. 19) (Morata y Lawrence, 1977; Lawrence y Struhl, 1996). Los primordios imaginales contienen por tanto, al formarse, células de ambas poblaciones (Cohen et al.,

1991) El gen selector *engrailed* (*en*) se expresa exclusivamente en los compartimentos posteriores (Morata y Lawrence, 1975; Lawrence y Morata, 1976; Kornberg, 1981), siendo la expresión de este gen

en el compartimento anterior suficiente para transformarlo en posterior (Simmonds et al., 1985; Guillen et al., 1995; Tabata et al., 1995).

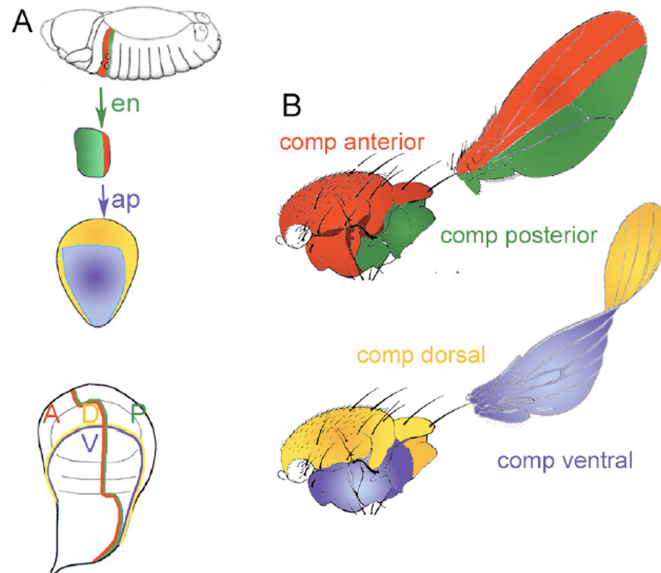


Figura I9. Formación de compartimentos en el disco imaginal de ala.

(A) La expresión de *engrailed* es exclusivamente posterior en cada segmento y disco imaginal determina el eje antero-posterior (A/P). La formación del eje dorso-ventral (D/V) está mediada por la expresión de *apterous* en los discos dorsales de ala y halterio. (B) Correspondencia de los compartimentos del disco imaginal con las estructuras adultas (cedido por Silvia Aldaz)

En los discos de ala y halterio existe al menos una subdivisión más. El gen *apterous* (*ap*) se expresa en un grupo de células de ambos discos constituyendo el compartimento dorsal, y determina la segregación dorso-ventral durante el segundo estadio larvario (Fig. I9) (García-Bellido et al., 1976; Cohen et al., 1992; Diaz-Benjumea y Cohen, 1993; Blair 2001). Aproximadamente al mismo tiempo aparece una tercera subdivisión en el disco de ala, que discrimina entre la región que formará el tronco (que recibe el nombre de notum) y la que formará el ala. Es importante mencionar que entre estas dos regiones no existe una restricción de linaje tan definida como en los anteriores compartimentos. La generación de esta última división territorial del disco se debe a la actividad de la vía de señalización del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), que activa la expresión de los genes del complejo *iroquois* (C-Iro), necesarios para el establecimiento de la identidad de notum (Simcox, 1997; Wang et al., 2000; Zecca y Struhl 2002a, b). Aunque estos estudios han sido realizados exclusivamente en el disco de ala, suponemos que la formación de la división tronco-apéndice ocurre de manera similar en el disco de halterio para diferenciar el desarrollo del metanotum adulto frente al del halterio, constituido por tres regiones denominadas escabelo, pedicelo y capitelo.

Establecimiento del patrón y crecimiento en el disco imaginal de ala.

Todos los procesos necesarios durante el desarrollo podrían por tanto agruparse dentro de dos categorías, el establecimiento del patrón y el crecimiento. Sin embargo, ambos procesos, patrón y tamaño, están genéticamente relacionados. En la mayoría de los animales cada órgano

tiene una forma y tamaño característicos y un patrón proliferativo complejo, y deja de crecer una vez se alcanza un tamaño determinado (revisado en Bryant y Simpson, 1984). La visión más generalizada es que el patrón determina el crecimiento celular y no viceversa. La evidencia más importante que apoya esta idea es que ambos tipos de procesos están a veces coordinados genéticamente, siendo controlados simultáneamente por vías de señalización como en el caso de *decapentaplegic* (*dpp*) y *wingless* (*wg*) en el disco imaginal. Probablemente el caso más paradigmático sea el caso de la vía de *dpp* en el disco imaginal de ala.

Dpp pertenece a la familia de factores BMP (Bone Morphogenetic proteins), a su vez integrante de la superfamilia de los factores TGF-beta (Transforming growth Factors beta). En los discos imaginales dorsales torácicos, *dpp* se transcribe en una banda de células del compartimento anterior, estrictamente adyacente al borde de compartimentos antero-posterior, en respuesta a una elevada actividad de la vía de Hedgehog (Fig. I10D, violeta). La proteína Hedgehog (Hh) es un morfógeno difusible de corto alcance, producido por células del compartimento posterior (que expresan *engrailed*) (Fig. I10A, C, D). Hh no es capaz de señalizar en el compartimento posterior debido a que la proteína En impide que las células posteriores respondan al morfógeno (Fig. I10B) (Basler y Struhl, 1994; Tabata y Kornberg 1994; Zecca et al., 1995). En el compartimento anterior, Hh difunde unos 4-5 diámetros celulares y activa una cascada de transducción que induce la expresión de una serie de genes diana con patrones en forma de bandas más o menos extensas paralelas al eje A/P (revisado en Vervoot, 2000; Ingham y McMahon, 2001; Schwank et al., 2011), entre los cuales se encuentra *dpp* (Fig. 10D).

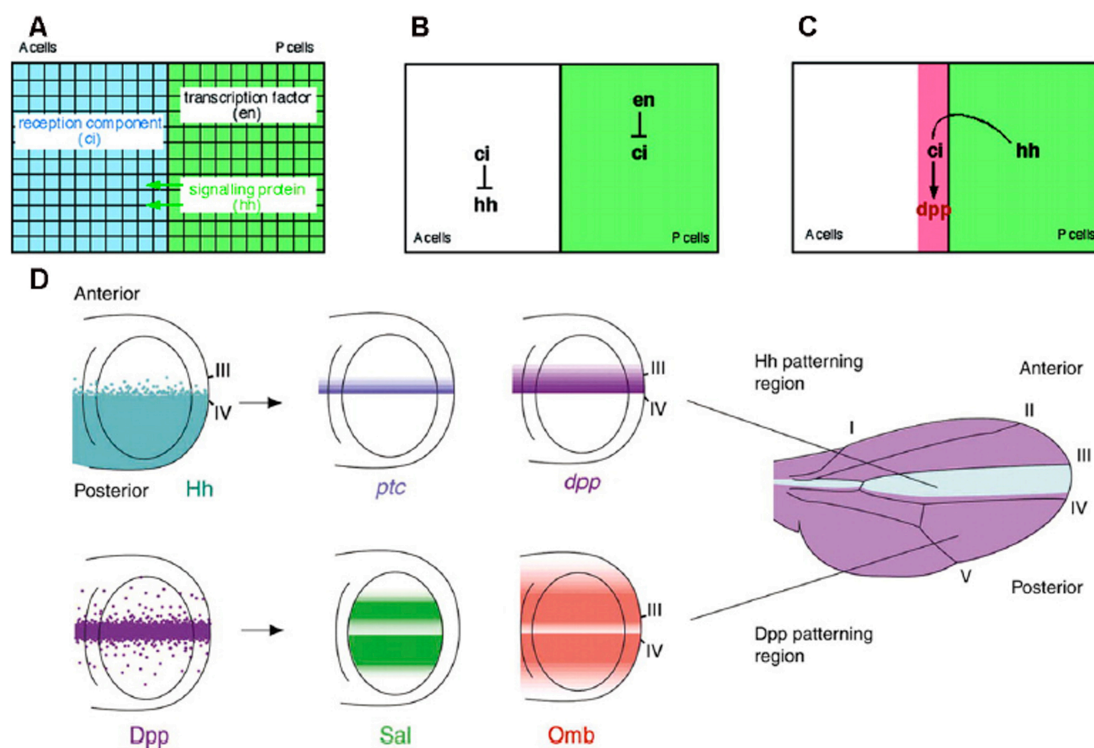


Figura I10. Activación y función del organizador A/P.

(A) Engrailed (En), presente en el compartimento posterior, induce la expresión de *hedgehog* (*hh*), que a su vez induce la expresión de genes de respuesta en el borde A/P sólo en las células anteriores (que tienen el factor de transcripción *Cubitus Interruptus* (*ci*), un transductor de la señal). (B) Engrailed reprime la expresión de *ci* en el compartimento posterior (no hay transducción de Hh en P) mientras que Ci reprime la expresión de *hh* (sólo se emite morfógeno en P). (C) *dpp* (gen de respuesta a Hh) se expresa exclusivamente en el borde A/P. (D) Hh y Dpp son capaces de activar, dependiendo de su concentración, a varios genes diana. Mediante estos genes de respuesta, Dpp es el responsable del patrón de casi toda el ala adulta (violeta) excepto la región entre las venas 3 y 4 (azul), que depende de Hh (tomada de Tabata y Takei, 2004).

Dpp también es una proteína difusible que es secretada a la matriz extracelular, a través de la cual difunde hacia los extremos anterior y posterior del disco, generando un gradiente (Fig 12A). La unión del ligando Dpp al receptor Punt provoca la fosforilación de otro receptor, Thick veins (Tkv), a partir de lo cual se ponen en marcha una cascada de transducción de la señal de Dpp, que activa una serie de genes de acuerdo a la concentración de la proteína difusible Dpp en el “pouch” o “bolsa” del disco de ala (región del disco imaginal que formará el apéndice adulto) (Fig. 110D) (Tabata y Takei, 2004; Schwank et al., 2011). Tanto mutaciones de pérdida como de ganancia de función de *dpp* señalan que este gen está implicado en regular el crecimiento (revisado en Affolter y Basler, 2007).

Es importante mencionar que todos estos estudios han sido realizados en el “pouch” del disco imaginal de ala. El crecimiento de otras regiones del disco, como por ejemplo el notum, no depende de *dpp*, y no está claro aún cuales son los responsables.

Aparte de los mecanismos de crecimiento provocados por morfógenos como *dpp* o *wg*, existen también otras vías de señalización implicadas en crecimiento, tales como las vías de *hippo* o de la insulina, cuya actividad modifica el ciclo celular (Revisado en Edgar, 2006) o el aumento de la masa de las células (Revisado en Hietakangas et al., 2009), respectivamente.

Los genes Hox y el control del tamaño

Mediante la integración pues de las actividades de vías de señalización implicadas en la formación de patrón y/o tamaño, una estructura es capaz de lograr su forma y tamaño correctos dentro de un individuo. Sin embargo, el rango de estructuras presentes en el reino animal, e incluso dentro de un mismo individuo, es extenso. Cómo sabe cada segmento qué estructuras tienen que generarse y la manera por la que éstas llegan a su tamaño y forma adecuados es responsabilidad de los genes Hox.

Un caso estudiado previamente donde una gran diferencia de tamaño se genera a causa de la actividad de un gen Hox es el de los halterios, donde se requiere *Ubx*, y son de tamaño mucho menor que las alas, donde no se requiere la proteína homeótica. Se ha encontrado que *Ubx* es capaz de modificar a diferentes niveles vías de señalización que intervienen en el crecimiento, tales como las de Wg, Epidermal growth factor receptor (EGFR) y Dpp (Weatherbee et al., 1998; Shashidhara et al., 1999; Galant et al., 2002; Prasad et al., 2003; Pallavi et al., 2006; Crickmore and

Mann, 2006; de Navas et al., 2006; Mohit et al., 2006; Hersh et al., 2007; Makhijani et al., 2007), En concreto, y en relación con la vía de Dpp, se ha descrito que *Ubx* regula tanto la cantidad de *dpp* que se expresa en los discos imaginales de ala y halterio (siendo menor en el disco de halterio), como la difusión de la proteína Dpp (siendo también menor en el disco de halterio). De esta forma, *Ubx* disminuye la expresión y actividad de Dpp en el disco de halterio, siendo este hecho responsable en parte del menor tamaño de este apéndice en comparación con el ala (Crickmore and Mann, 2006; de Navas et al., 2006; Makhijani et al., 2007).

El hecho de que *Ubx* controle la difusión de un morfógeno como Dpp pone de manifiesto el sorprendente hecho de que, mientras que la diferenciación celular es un fenómeno autónomo celular (Morata y García Bellido, 1976; Hart y Bienz, 1996; Roch y Akam, 2000) el control del tamaño por el gen homeótico tiene también un componente no autónomo celular, ya que controla la cantidad de morfógeno que llega más allá de las células en cuestión, y por lo tanto limita a la capacidad de crecimiento de regiones más allá de donde se está expresando. Esta observación está respaldada por los resultados obtenidos en los análisis clonales de pérdida de *Ubx*. En ellos, se demuestra cómo cuando *Ubx* es eliminado de grandes grupos de células en el disco imaginal de halterio, incluso cuando esto ocurre ya a la mitad del desarrollo larvario, se observan transformaciones de tejido de halterio en ala, incluyendo, por supuesto, un aumento en el número de células en el disco de halterio. No obstante, cuando se elimina *Ubx* tan sólo en pequeños grupos de células, las células mutantes no parecen proliferar más que las células *Ubx*⁺ circundantes. Por ello, parece que *Ubx* no está dictando el crecimiento o la tasa de proliferación de cada célula individualmente, al menos durante el desarrollo del “pouch” del disco imaginal de halterio. Este fenómeno parece ir en contra de un control de la proliferación celular por el gen homeótico mediante la modificación de componentes intracelulares pertenecientes a vías como la de Hippo e insulina o a procesos tales como la apoptosis, ciclo celular o tamaño celular, sino que más probablemente se deba a un control de la señalización por morfógenos, como demuestran los experimentos de Dpp detallados anteriormente. La regulación de *dpp* por *Ubx* constituye, por tanto, un modelo de regulación del crecimiento por genes Hox que hace falta validar en otros casos.

El desarrollo pupal del tórax

Todos los trabajos realizados para estudiar el control que los genes Hox ejercen sobre el crecimiento en *Drosophila* están realizados en los discos imaginales y por lo tanto aportan información acerca del crecimiento y el patrón de las estructuras durante el periodo larvario.

Sin embargo, en los insectos holometábolos como *Drosophila*, tiene lugar una metamorfosis durante la cual se forma el individuo adulto a partir de los tejidos de la larva. Todo el exoesqueleto de la mosca deriva de los tejidos imaginales, de los discos en el caso de la cabeza, el

tórax, la analia y la genitalia, y de los nidos de histoblastos en el caso del abdomen. Estos discos e histoblastos sufren, durante la metamorfosis, profundos cambios morfológicos que requieren cambios en la adhesividad, proliferación, tamaño y forma celular, migración, delaminación etc. Por lo tanto, es posible que los genes Hox pudieran regular propiedades como el tamaño de los órganos adultos durante el periodo pupal.

Sólo existe un estudio en la bibliografía que describe los cambios en la morfología y tamaño celular que ocurren en el disco de halterio durante la pupación y su regulación por *Ubx* (Roch y Akam, 2000). En él se muestra, entre otras cosas, cómo las células del ala sufren un gran aumento de tamaño desde las 32h de la pupación en adelante, lo cual explicaría en gran medida la diferencia de tamaño existente entre ambos apéndices, además de los estudios que relacionan el tamaño con la regulación de la vía de Dpp, anteriormente descritos.

Sin embargo, la inspección de la morfología y tamaño de la mosca permite apreciar una gran diferencia de tamaño no solo entre los apéndices torácicos, ala y halterio, sino también, de manera incluso más acusada, entre los segmentos torácicos (Fig. I11). Y es que en todos los insectos, el tórax adulto (que en su parte dorsal recibe el nombre de notum) está compuesto por tres segmentos, T1, T2 y T3, los cuales presentan un tamaño muy diferente. En *Drosophila*, la mayor parte del notum corresponde al T2 (mesonotum, azul en Fig. I11), mientras que el T1 (pronotum, violeta en Fig. I11) es claramente reducido, y el T3 (metanotum, verde en Fig. I11) prácticamente indetectable a excepción de una diminuta banda de tejido que une dorsalmente las regiones más proximales de los halterios (escabelos) (Fig. I11B,C). En el caso del T2 y el T3, meso- y metanotum se forman a partir de la región presuntiva de notum en los discos imaginales de ala y halterio, respectivamente (Fig. I11A). Sin embargo, en el estadio de larva 3 tardía, previo a la pupación, ambas regiones en discos homólogos no presentan una diferencia de tamaño tan acusada como los tejidos adultos (Fig. I11A), siendo el primordio de notum del disco de ala aproximadamente tres veces más grande que el del disco de halterio. Existe por tanto un incremento dramático en la diferencia de tamaño entre los diferentes segmentos en el notum adulto, generada exclusivamente durante la pupación, lo cual es señal inequívoca de un mayor crecimiento neto del T2 respecto del T3.

Si bien, como hemos descrito, se han realizado estudios del papel de los genes Hox (como *Ubx*) en el control del tamaño de los apéndices dorsales (ala y halterio), hasta ahora no existe ninguna descripción acerca de cómo los genes Hox regulan el crecimiento de los distintos segmentos que componen el tórax adulto y no los apéndices, durante la metamorfosis. La segunda parte de la tesis se centra por tanto en el estudio del crecimiento pupal de estas dos estructuras, los mecanismos de crecimiento empleados en cada una de ellas y el posible papel del gen *Ubx* en su regulación.

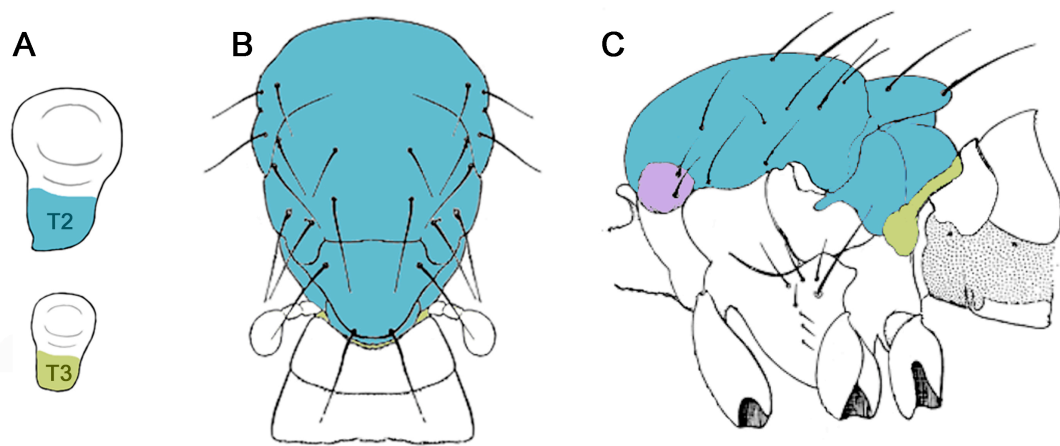


Figura I11. Representación esquemática del notum de *Drosophila*.

(A) Regiones presuntivas de notum en los discos imaginales de ala y halterio, a partir de los cuales se desarrolla el notum adulto (vista dorsal en B, vista lateral en C) tras la metamorfosis. La diferencia de tamaño entre T2 (azul) y T3 (verde) es mayor en el adulto que en los discos imaginales. (T1, en violeta, proviene del disco imaginal humeral).

objetivos

En la primera parte de esta tesis se pretende descifrar aspectos paradójicos de la autorregulación del gen Hox *Ultrabithorax (Ubx)* en *Drosophila melanogaster* no comprendidos hasta el momento, que se ponen de manifiesto al producirse fenotipos típicos de falta de función de *Ubx* cuando la concentración de la proteína homeótica en las células del tercer segmento torácico (T3) rebasa los niveles silvestres. En la segunda parte se pretende describir la estrategia de crecimiento que adoptan los distintos segmentos que componen el notum adulto de *Drosophila*, y cómo *Ubx* regula estas estrategias en el T3 para conseguir el tamaño adecuado de dicho segmento. Para esto se han abordado específicamente los siguientes objetivos:

A) Analizar el estado transcripcional del gen *Ubx* endógeno en las condiciones de sobreexpresión, su evolución en el tiempo durante el resto del desarrollo y sus consecuencias en el fenotipo adulto.

B) Estudiar la función de las proteínas del grupo *Polycomb* y *trithorax* en la autorregulación negativa de *Ubx* y en los fenotipos de pérdida de función inducidos por sobreexpresión del mismo.

C) Analizar mecanismos de represión similares en otros genes homeóticos: *engrailed*, *abdominal-A* y *Abdominal-B*.

D) Estudiar el papel del mecanismo de represión permanente durante el desarrollo silvestre de *Drosophila melanogaster*.

E) Caracterizar los diferentes segmentos del notum adulto en base a marcadores genéticos.

F) Analizar la proliferación y el tamaño de las células del meso y metanotum durante el desarrollo pupal y en relación a la expresión del gen *Ubx*.

materiales y métodos

m1. LINEAS DE *D. melanogaster* EMPLEADAS:

m1A. Líneas mutantes:

Las distintas líneas mutantes que han sido empleadas para desarrollar esta tesis han sido: *Pc*³ (Lewis, 1978) y *trx*^{E2} (Kennison and Tankum, 1988), Tft (Ritterhof, 1952) y la deficiencia *Df109* (*DfUbx109*), que descubre los genes *abd-A* y *Ubx* (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero et al., 1985).

m1B. Líneas lacZ:

Para estudiar el comportamiento de un gen se recurre habitualmente a la observación de un “gen chivato”, que en nuestro caso es el gen de la B-galactosidasa, que se encuentra insertado en elementos P. La inserción de uno de estos elementos en un cierto gen hace que la transcripción del gen lacZ reproduzca la expresión de dicho gen total o parcialmente tanto temporal como espacialmente (O’Kane y Gehring, 1987). Se crean líneas con estas características mediante la técnica conocida como “enhancer trap” o “trampa de activadores”. En esta técnica se moviliza un

elemento P-LacZ de modo aleatorio por el genoma y se seleccionan las líneas que presentan patrones de expresión de la β -galactosidasa de interés, o bien se realizan construcciones en las que el gen chivato se sitúa bajo el dominio de acción de las secuencias que controlan la expresión del gen a estudiar. Estas construcciones se introducen luego en la línea germinal de embriones para insertarlas de forma estable en el genoma. En esta tesis se han empleado las siguientes líneas P-lacZ como chivatos del gen correspondiente: *Ubxlac1* (Casares et al., 1997), *abd-A-lacZ* (HC7JA1) (Bender y Hudson, 2000), *Abd-B-lacZ* (HCJ199) (Bender y Hudson, 2000), *en-lacZ* (ryxho25) (Hama et al., 1990) e *iro-lacZ* (Gómez-Skarmeta et al., 1996).

m1C. Otras líneas indicadoras:

Para seguir la expresión de diferentes genes se usaron también líneas en las que un elemento P con una secuencia codificante para una proteína fluorescente se colocaba bajo el control de un promotor ubicuo, como *Ubi-DE-cad-GFP* (Oda y Sukiota, 2001) o inserciones P en los genes que actúan como "atrapadores de proteína", tales como *hh-Dsred* (Akimoto et al., 2005) y *nrg-GFP* (Morin et al., 2001).

m1D. Expresión ectópica de genes

Mediante la técnica de Gal4/UAS se puede expresar un producto que, bajo el control de las secuencias activadoras UAS, se active sólo en el lugar y el momento en que se produzca la proteína Gal4, la cual responde a determinados "enhancers" génicos que varían en cada línea de moscas (Brand y Perrimon, 1993). Para hacer esto se han usado las siguientes líneas:

m1E. Líneas Gal4:

MS372-Gal4 (cedida por F. Jiménez), *Ubx-Gal4^{SS.2}* (A. Sánchez y Ernesto Sánchez-Herrero), *C-765-Gal4* (Guillén et al., 1995), *sd-Gal4* (M. Calleja y G. Morata), *Ubx-Gal4^{M1}*, *Ubx-Gal4^{M3}* (de Navas et al., 2006), *dpp-Gal4* (Staehling-Hampton et al., 1994), *en-Gal4* (Tabata et al., 1995), *ptc-Gal4* (Hinz et al., 1994), *ap-Gal4* (Calleja et al., 1996) y *hh-Gal4* (Tanimoto et al., 2000).

m1F. Líneas UAS:

UAS-Ubx (Castelli-Gair et al., 1994; Michelson, 1994), *UAS-Ubx-HA* (Ronshaugen et al., 2002), *UASdsRNA>Ubx* (Monier et al., 2005), *UAS-abd-A* (Michelson, 1994), *UAS-Abd-B(m)* (Castelli-Gair et al., 1994), *UAS-en* (Guillén et al., 1995), *UAS-Ubx^{UbdA}*, *UAS-Ubx^{HX}* (Merabet et al., 2007), *UAS-UbxAf* (from *Artemia franciscana*) (Ronshaugen et al., 2002), *UAS-Pcl-RNAi* (Vienna *Drosophila* RNAi Center), *UAS-GFP*, *UAS-red* (Flybase).

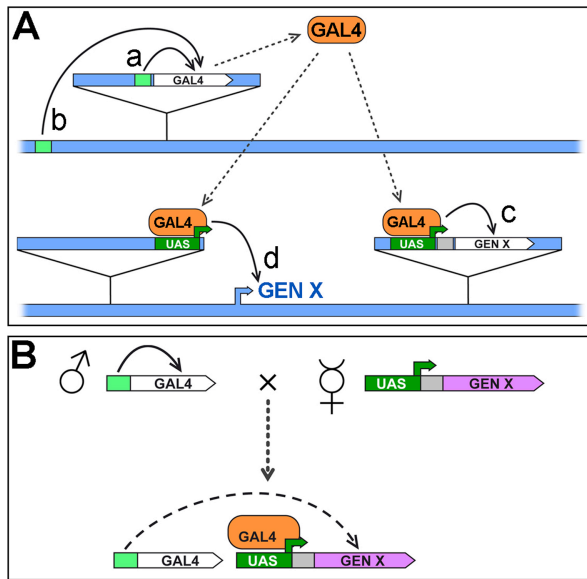


Figura M1. El sistema Gal4/UAS. (A) Un transposón que lleve el gen *Gal4* bajo el control de una secuencia reguladora (caja verde claro) incluida en el transposón (a) o que actúe desde el ADN genómico adyacente (b), producirá proteína Gal4 en las condiciones determinadas por dicha secuencia reguladora. Esta proteína, a su vez, regulará positivamente a cualquier gen x, ya sea un gen incluido en un transposón bajo el control de la secuencia UAS (caja y flecha verde oscuro, c) o un gen endógeno (flecha azul) hacia el que se orienta la secuencia UAS incluida en el extremo de un transposón (c). (B) El sistema Gal4-UAS es binario, es decir, el transgén *Gal4* y el transgén *UAS-x* están en estirpes independientes, que se cruzan para producir la sobreexpresión en la descendencia (Cedida por J.Navascués).

Un refinamiento de la técnica Gal4/UAS consiste en incluir un tercer transposón que expresa, bajo el control del promotor de tubulina, una variante termosensible de la proteína de levaduras Gal80 (*tub-Gal80^{ts}*; McGuire et al., 2003). La proteína Gal80 impide eficientemente el funcionamiento de la Gal4; así, mientras las moscas se mantengan a la temperatura permisiva (18°C), la proteína Gal80 no permite que la proteína Gal4 active el transgén UAS. Al incubar las moscas a 29°C, la proteína Gal80^{ts} se inactiva y la proteína Gal4 realiza su función. De este modo, al patrón de expresión dirigido por la proteína Gal4 puede añadirse una restricción controlable en el tiempo. Esta técnica fue empleada para hacer expresiones transitorias de *Ubx* utilizando diferentes líneas Gal4. Para ello, se crecieron las larvas a temperatura restrictiva durante el periodo embrionario, a partir del cual se transfirieron a la temperatura permisiva durante un tiempo variable, con un mínimo de 24h, durante el cual se produjo la expresión de la línea *UAS-Ubx*. Posteriormente se volvieron a transferir las larvas a la temperatura restrictiva, y se diseccionaron los discos una serie de días después, para analizar los cambios de expresión de genes endógenos permanentes en el tiempo.

m2. ANALISIS CLONAL:

Para estudiar la falta de función de genes cuyas mutaciones son letales se ha hecho el análisis de clones de células mutantes para el gen que se deseaba estudiar. Para la realización de esta tesis se generaron diferentes tipos de clones:

m2A. Clones de recombinación mitótica:

Estos clones se generan mediante el sistema FLP/FRT (Xu y Rubin, 2003) (Fig. M1). Las secuencias FRT son secuencias de levadura que recombinan entre sí en presencia de la enzima flipasa (*flp*), produciendo células homocigóticas para el brazo cromosómico en el que se encuentra la secuencia FRT (Golic, 1991; Xu y Rubin, 1993). La flipasa *hs-flp122* se describe en Struhl y Basler, 1993; al estar controlada por un promotor dependiente de temperatura, sólo estará presente en el momento en que se proporcione un choque térmico (37°C), que será el momento elegido para inducir los clones deseados. Los clones en los discos imaginales fueron identificados por la pérdida del marcador GFP. Las líneas empleadas para estos análisis fueron las siguientes: *Ubi-GFP FRT2A* y *hs-CD2 ri FRT2A Pc^{XT109}* (Beuchle et al., 2001).

m2B. Clones de expresión ectópica:

Se trata de clones de sobreexpresión por escisión (= "flip-out"; Struhl y Basler, 1993) en los cuales se provoca la recombinación de dos secuencias FRT posicionadas *en cis* en el cromosoma. Esto genera la escisión de la secuencia comprendida entre ambas y pone en contacto las secuencias adyacentes a ambas de modo que se activa tan sólo en esas células la expresión una copia de Gal4. La línea que empleamos para estos experimentos fue la siguiente: *y w hs-flp122; tub-Gal4>flu-GFP>Gal4* (Zecca y Struhl, 2002)

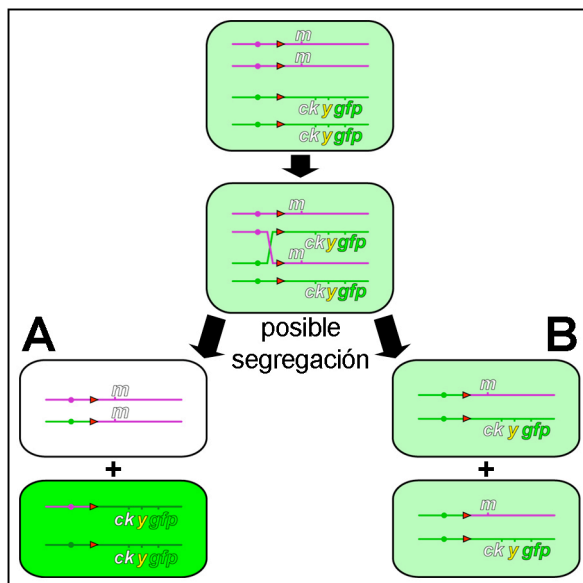


Figura M2. La recombinación mitótica. Durante la división celular, cuando se ha replicado el material genético, la recombinación mediada por la Flp sobre secuencias FRT *en trans* permite intercambiar cromátidas homólogas. Así, durante la segregación de estas cromátidas, puede suceder que una célula hija herede las dos copias mutantes de un gen *m* (caso A). En tal caso, si el cromosoma homólogo tenía genes marcadores, como *yellow*, *crinkled* o *gfp*, se podrá reconocer el genotipo del clon resultante en la cutícula o mediante la intensidad de la fluorescencia. (Como se indica en el esquema: fuerte para las células del clon gemelo, nula para las células mutantes, e intermedia para las heterocigóticas) (Cedido por J. Navascués).

m2C. Clones mutantes MARCM:

Estos clones (MARCM=mosaic analysis with a repressible cell marker; Lee y Luo, 1999) son mutantes para un gen y al mismo tiempo de expresión ectópica de un producto; los clones se

identifican por la ganancia de GFP y pérdida de lacZ). La proteína Gal4, aunque se produce en todas partes, solo podrá estar funcional en las células en donde se haya eliminado la expresión de Gal80 gracias al proceso de recombinación mitótica. Mediante esta técnica conseguimos estudiar la tasa de proliferación en el tórax durante la metamorfosis, induciendo clones al principio de este periodo y visualizándolos al final, en individuos faratos. Los genotipo completo de las moscas que utilizamos en estos experimentos fueron: *y w hs-flp122 tub-Gal4 UAS GFP; FRT82B tub-Gal80/TM6B* y *y w; FRT82B lacZ/TM6C*

m3. PREPARACIÓN DE CUTÍCULAS ADULTAS.

Para observar el fenotipo de los individuos adultos se conservaron en una disolución compuesta por tres partes de etanol y una parte de glicerol (Lawrenve et al., 1986), se calentaron en KOH 10% durante 1-2 min. y se deshidrataron con etanol absoluto y propanol. Una vez hecho esto se diseccionaron los individuos y las partes seleccionadas se montaron en Euparal (ASCO) para su análisis al microscopio óptico.

m4. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Se emplearon estas técnicas para estudiar los patrones de expresión de un cierto gen al detectar mediante anticuerpos marcados las proteínas que codifican.

m4A. Tinción en embriones:

Lavar los embriones 3 x 5 min. con PBT para rehidratarlos.

Lavar después 3x 10 min con PBT.

Añadir el anticuerpo primario e incubar toda la noche a 4°C.

Retirar el anticuerpo y lavar 3 x 10 min.

Añadir el anticuerpo secundario marcado con algún agente fluorescente e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.

Lavar con PBT 4 x 15 min.

Montar los discos imaginales en Vectashield (Vector Laboratorios, Inc.).

m4B. Tinción en larvas:

Diseccionar larvas del estadio a elegir en PBS durante un tiempo máximo de 20 min.

Una vez diseccionadas sustituir el PBS por una mezcla de Paraformaldehído al 4%, DOC

(deoxicolato sódico) al 0.1% y tritón X-100 al 0.1%

Incubar en la mezcla fijadora durante 25 min.

Sustituir el fijador por PBS y lavar durante 5 min.

Lavar 2 x 10 min. con tampón de lavado (PBS + BSA (albúmina de suero bovino) 1% + Tritón X-100 al 0.03%)

Incubar con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C.

Retirar el anticuerpo primario y lavar 4 x 15 min. con tampón de lavado.

Añadir el anticuerpo secundario marcado con algún agente fluorescente e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.

Lavar con tampón de lavado 4 x 15 min.

Montar los discos imaginales en Vectashield (Vector Laboratorios, Inc.).

m4C. Tinción en adultos:

Se realizaron de manera idéntica a las tinciones en discos imaginales.

m4D. Tinción inmunohistoquímica con X-GAL:

Diseccionar discos imaginales en PBS.

Fijar los discos con glutaraldehído al 1% (4 µl de glutaraldehído en 400 µl de PBS) durante 2 min.

Lavar 2 X 3 min. con PBS.

Añadir la mezcla de tinción y dejar incubando a 37°C hasta que la tinción sea visible.

Si se deja durante toda la noche conviene cubrir el pocillo con un portaobjetos para evitar que se evapore la mezcla de tinción.

Mezcla de tinción:

500 µl de ferrocianuro potásico

500 µl de ferricianuro potásico

8.44 ml de PBS 1X

300 µl de tritón X100 al 10%.

250 µl de X-Gal (8% en dimetilformamida)

Guardar protegiendo de la luz a 4°C.

5. LOCALIZACIÓN DE ELEMENTOS P EN EL GENOMA.

La localización del punto de inserción de distintos elementos P en el genoma se realizó mediante la técnica de PCR inversa (Ochman et al., 1988). Esta técnica se basa en el empleo de cebadores (primers) orientados en direcciones divergentes. Son cebadores diseñados contra las regiones de los extremos de los elementos P. Primeramente se tuvo que digerir el genoma de las moscas con una enzima de restricción que tenga un punto de corte cerca del extremo del

elemento P y otro en un punto indeterminado del genoma que se suele encontrar próximo a la inserción. Una vez cortado el genoma se procedió a ligar los fragmentos. Al producirse la reacción de PCR con iniciadores orientados hacia la región exterior al elemento P amplificamos la zona genómica que flanquea el inserto. Luego, a partir de la secuencia de la región amplificada pudimos determinar el punto exacto de inserción.

m5A. PCR inversa:

EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO:

Congelar 30 moscas a -80°C. Homogeneizarlas en 200 µl de tampón A (Sambrook et al., 1989)

Una vez bien homogeneizadas se añaden otros 200 µl de tampón A.

Se incuba a 65°C durante 30 min.

Mientras se incuba se prepara la mezcla KAc (5M)/ Lic. (6M) en proporción 1:2.5

Echar 800 µl de la solución.

Esperar 10 min. manteniéndolo en hielo.

Centrifugar 10 min. y retirar 1 ml de sobrenadante.

Añadir 600 µl de isopropanol al sobrenadante y centrifugar 15 min. más.

Retirar el sobrenadante de esta última centrifugación.

Dar un pulso con la centrífuga, retirar el sobrenadante que quede y añadir 200 µl de etanol al 70%.

Secar el etanol y resuspender en 150 µl de TE. Esto puede guardarse a -20°C.

DIGESTIÓN

Preparar una mezcla según el esquema:

DNA 10 µl

Tampón digestión 2.5 µl (Sambrook y cols., 1989)

RNAse 2 µl

H₂O dd 8.5 µl

Enzima 2 µl

Cada enzima de restricción se usa a unas unidades por µl concretas. Según la enzima que se use por lo tanto se añadirá una cantidad u otra y habrá que modificar en consonancia la cantidad de H₂O que se añade para que el volumen final sea el mismo. En nuestro caso hemos empleado SAU IIIA y MSP I como enzimas de restricción. Dejar durante toda la noche digiriendo a la temperatura óptima de la enzima que se esté usando. Parar la reacción incubando en un baño a 65°C durante 20 min. Conviene comprobar con un gel de agarosa al 1% que ha habido digestión cargando 10 µl del supuesto producto de la digestión.

LIGACIÓN:

Preparar por cada producto de digestión la siguiente mezcla:

DNA digerido 10 µl

Tampón de ligación 10X (+ATP 0.5 mM) 40 µl

H₂O dd 350 µl

Ligasa 2 µl

Incubar durante toda la noche a 4°C.

Precipitar añadiendo el 10% del volumen de ligación con sales (NaAc 3M) y 2.5 veces el volumen de etanol absoluto frío (-20°C).

Esperar 10 min.

Centrifugar 15 min. a 4°C.

Retirar el sobrenadante, dar otro pulso de centrífuga y eliminar los restos de sobrenadante.

Añadir etanol al 70% para lavar.

Centrifugar un poco y retirar el sobrenadante.

Dejar que seque en la estufa a 37°C.

Resuspender en 150 µl de TE.

PCR:

Por cada tubo de muestra digerida y ligada se hace el siguiente preparado:

ADN ligado 10 µl

dNTPs 2mM 2 µl

cebador 1 1 µl

cebador 2 1 µl

tampón de taq 10X 5 µl

MgCl₂ 2 µl

H₂O dd 27 µl

2 unidades de Taq-polimerasa 2 µl

El ADN ligado se añade en el último lugar.

Los componentes se mezclan en un tubo Eppendorf que se coloca en la máquina de PCR con el siguiente programa:

5 min. a 95 °C

1 min. a 95 °C

1 min. a 56 °C

2 min. a 68 °C

· Estos últimos tres pasos se repiten en 35 ciclos.

10 min. a 72 °C

CEBADORES:

Para los experimentos de genética molecular realizados en esta tesis se han utilizado los siguientes cebadores:

pLAC 4: 5'-ACT GTG CGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT-3'

pLAC1: 5'-CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT-3'

Pry1: 5'-CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT-3'

Pry2: 5'-CTT GCC GAG GGG ACC TTA TGT TATT-3'

Estos cebadores fueron los usados para realizar las PCR inversas que sirvieron para localizarlas líneas *Ubx-Gal4^{SS.2}* y *MS372-Gal4*. pLAC4 y pLAC1 se unen al extremo 5' de los elementos P. Pry1 y Pry2 se unen al extremo de 3' de los elementos P. Estas parejas de cebadores sirven para amplificar en direcciones opuestas desde el mismo extremo del elemento P una vez digerido y ligado el ADN genómico.

m6. ANTICUERPOS

Para el estudio de la expresión de distintos genes se han empleado los siguientes anticuerpos:

Anti-Ubx: cedido por R. White, desarrollado en ratón (White y Wilcox, 1984). Usado 1/10

·Anti-β-Galactosidasa: Cappel, desarrollado en conejo. Usado 1/2000

·Anti-β-Galactosidasa: Sigma, desarrollado en ratón. Usado 1/100

·Anti-En: Hybridoma Bank, desarrollado en ratón (Patel et al., 1989). Usado 1/50

·Anti-Abd-B: cedido por M. Bienz, desarrollado en conejo (deLorenzi y Bienz, 1990). Usado 1/125

·Anti-Abd-A: cedido por J. Casanova, desarrollado en rata (Macías et al., 1990). Usado 1/1000

·Anti-HA: Roche, desarrollado en rata, usado 1/2000

·Anti-rata conjugado con flouróforo verde, rojo o azul: Jackson InmunoResearch Laboratorios, Inc. Usado 1/200

·Anti-ratón conjugado con flouróforo verde, rojo o azul: Jackson InmunoResearch Laboratorios, Inc. Usado 1/200

·Anti-conejo conjugado con flouróforo verde, rojo o azul: Jackson InmunoResearch Laboratorios, Inc. Usado 1/200

m7. ADQUISICIÓN Y TRATAMIENTO DE IMÁGENES

Las imágenes de microscopia convencional fueron obtenidas en un microscopio Leica acoplado a una cámara digital Leica 480 ó 580. Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron mediante sistemas MicroRadiance (Bio-Rad) acoplado a un microscopio vertical Zeiss Axioskop2 (dos canales) o LSM510 META (Zeiss; tres canales), y procesadas digitalmente utilizando Zeiss LSM Image Browser o MetaMorph y Adobe Photoshop 7.0.

m8. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO CELULAR EN DISCOS IMAGINALES DE TERCER ESTADIO LARVARIO.

Se eligió para el cálculo del tamaño celular la superficie correspondiente a la sección máxima a lo largo del eje Z, que corresponde con el nivel al cual se encontraba el núcleo. Para marcar los contornos celulares se emplearon las construcciones *Ubi-DE-cad-GFP* (Oda y Sukita, 2001). Los discos fueron montados sin aplastar, mediante la aplicación de espaciadores entre el portaobjetos y el cubreobjetos, para no alterar la distribución del volumen celular, y por lo tanto los valores de superficie máxima.

La estimación de la superficie celular se realizó en 30 células por disco en 5 discos de alar y en unas 50 por disco de 4 discos de halterio. Previo a calcular los tamaños medios de células de notum de T2 y de T3, quisimos comprobar si el tamaño celular medio en la región de presuntiva de notum variaba entre discos del mismo tipo (no mostrado) No encontramos a este respecto diferencias estadísticamente significativas en ningún caso, indicando que el tamaño celular es constante entre células pertenecientes a la misma región de discos de diferentes larvas.

ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO CELULAR EN FARATOS ADULTOS

Las células del adulto son básicamente planas, de manera que no fue necesario elegir entre una u otra sección como en los discos. Para marcar el contorno celular se empleó en este caso la construcción *nrg-GFP* (Morin et al., 2001).

Para realizar las mediciones de tamaño celular en el fragma mesotorácico, tanto en T2 como T3, y puesto que ambas estructuras tienen una estructura cóncava con una curvatura pronunciada, tuvimos que hacer proyecciones de varios planos tomados a diferentes niveles de la muestra, en cada uno de los cuales eliminamos la parte de tejido correspondiente al segmento que no deseábamos visualizar. De esa manera pudimos obtener imágenes para ambos segmentos del mismo fragma (ver Fig. 30A, B). Para no cometer errores en las mediciones, derivados de proyectar sobre un plano una superficie curva, adoptamos las siguientes estrategias: durante el montaje, intentamos dejar los tejidos lo mas planos posibles pero sin llegar a aplastarlos y distorsionar las células, y durante la estimación de la superficie, solo medimos células cuya inclinación respecto al

plano de proyección era mínimo, descartando el resto. Además, durante el procesamiento de los datos, previo al cálculo global del tamaño celular del fragma en cada individuo, comparamos el tamaño de las células de ambos segmentos en regiones muy pequeñas de apenas unas pocas células de longitud, de manera que en las mediciones de los dos segmentos tomadas la curvatura era la misma para ambos tejidos, cancelando por tanto el posible sesgo introducido en unos y otros.

ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS EN LA REGIÓN PRESUNTIVA DE NOTUM DE DISCOS IMAGINALES.

El recuento de células fue realizado en la región presuntiva de notum, delimitado en su borde proximal por la expresión de la inserción *iro-LacZ* (Gómez-Skarmeta et al., 1996). Se realizaron "stacks" de imágenes de las regiones mencionadas en discos de ala y halterio de larvas de tercer estadio en los cuales fueron marcados los contornos celulares (con *Ubi-DE-cad-GFP*) y los núcleos (con TO-PRO-3 iodide, TOPRO). Los discos fueron montados sin aplastar, mediante la aplicación de espaciadores entre el portaobjetos y el cubreobjetos. La distancia entre cada plano fue de 5 micrómetros, que es la distancia de compromiso a la cual podemos estar seguros que casi la totalidad de núcleos han sido fotografiados en un plano u otro, y que prácticamente ninguno ha sido repetido en dos planos adyacentes. Todo el tratamiento de imágenes se realizó con el programa Image J. A partir de las imágenes originales se generó un "stack" de imágenes binarias con la posición de los núcleos celulares, los cuales se recontaron automáticamente en cada plano y se sumaron para obtener un número total de núcleos en el disco.

resultados

A

ESTUDIO DE LA AUTORREGULACIÓN NEGATIVA DEL GEN *Ultrabithorax* EN *Drosophila melanogaster*

rA1. La sobreexpresión de *Ubx* produce fenotipos de falta de función de *Ubx*.

Estudios anteriores han descrito dos distintos fenotipos cuando se incrementan los niveles de expresión del gen *Ubx*. Por una parte, el incremento de dosis génicas produce una reducción del tamaño del halterio (Smolik-Utlaut, 1990). Por otra parte, la inducción de *Ubx* bajo el control de un promotor que responde al choque térmico genera, en una pequeña proporción de moscas, un fenotipo sutil de transformación parcial de halterio en ala, caracterizado por la aparición de quetas de ala en el halterio, rodeadas de tejido típicamente de halterio (Irvine et al., 1993). La explicación de este último fenotipo reside en la capacidad de *Ubx* para reprimir su propia expresión, tanto en la epidermis embrionaria como en los discos imaginales de halterio y pata (Irvine et al., 1993). Este tipo de transformaciones se ve dramáticamente incrementado en

expresividad y en penetrancia cuando *Ubx* se sobreexpresa mediante el sistema de levaduras Gal4-UAS y es objeto de nuestro análisis.

Utilizamos diferentes líneas Gal4 para expresar distintas líneas UAS-*Ubx*, con resultado variable. En algunos casos no se observaron fenotipos aberrantes. En otros casos la sobreexpresión de *Ubx* indujo en una reducción del tamaño del halterio, resultado éste consistente con trabajos anteriores (ver mas adelante; Fig. R8E) (Smolik-Utlaut, 1990). Sin embargo, cuando se utilizaron las líneas *MS372-Gal4*, *Ubx-Gal4^{SS.2}*, *dpp-Gal4*, *vg-Gal4*, *E132-Gal4* y *omb-Gal4* en combinación con las líneas UAS-*Ubx* (SG1) o UAS-*Ubx* (18-126-2), se desarrollaron individuos con fuertes transformaciones parciales del tercer segmento torácico (T3) hacia el segundo (T2) (Fig. R1). La expresividad de cada fenotipo es variable, y no en todos aquellos lugares donde se expresan las líneas Gal4 aparecen transformaciones. Encontramos así que las más frecuentes son las de halterio en ala (Figs. R1B,C, F comparar con el fenotipo silvestre en 1A), mientras que las de pata III en pata II (Fig. R1E) y las de metanotum, en mesonotum son más infrecuentes (Fig. R1D). Por otra parte, la expresividad de estos fenotipos también varía mucho, siendo muy común encontrar variaciones notables incluso entre las transformaciones de ambos lados de un mismo individuo (Fig. R11E).

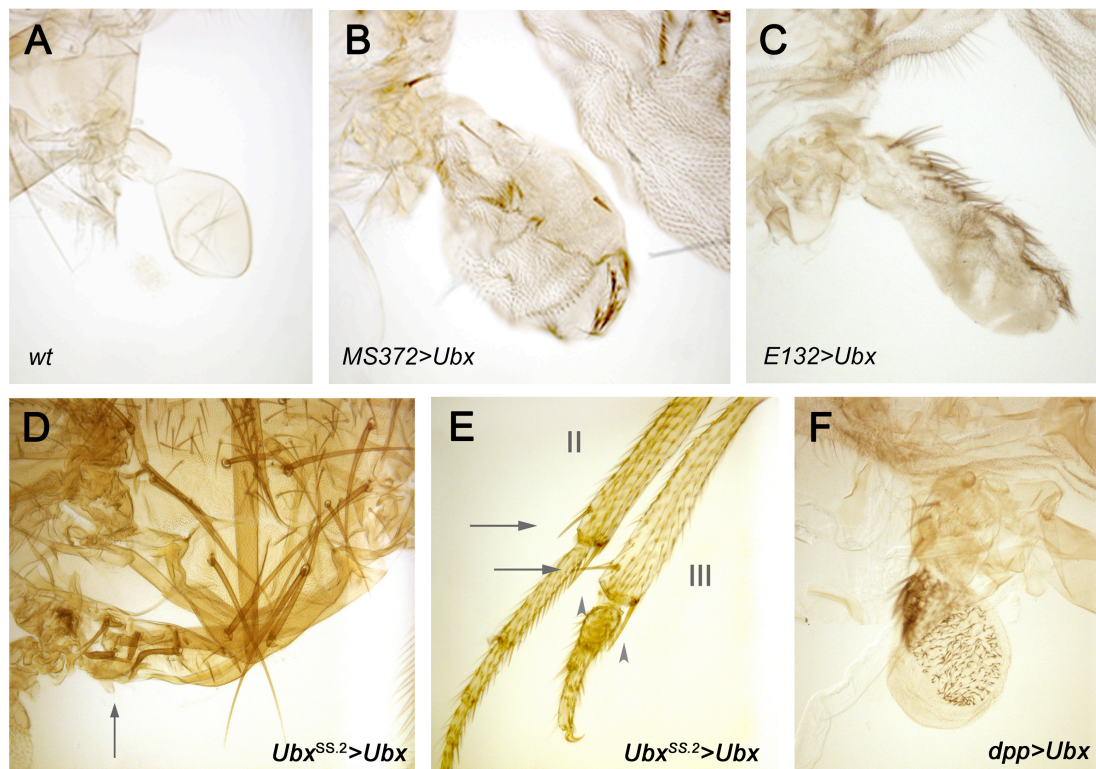


Figura R1. La sobreexpresión de *Ubx* en el halterio origina fenotipos de pérdida de función de *Ubx* en individuos adultos.

(A) Halterio silvestre. (B-F) Transformaciones de T3 en T2 en diferentes tejidos de la mosca adulta. (B,C,F) Moscas con genotipos *MS372-Gal4/UAS-Ubx* (SG1), *E132-Gal4/UAS-Ubx* (SG1) y *dpp-Gal4/+; UAS-Ubx* (SG1)/+, respectivamente, mostrando transformaciones parciales de tejido de halterio en ala. (D) Transformaciones de metanotum en mesonotum (flecha en D) y de pata III en pata II (E), visualizadas por la aparición en pata III de cerdas apicales y preapicales (cabezas de flecha en E) propias de pata II (flechas en E).

Tanto la frecuencia de aparición de las transformaciones como su expresividad varían en función de la temperatura ya que el sistema Gal4-UAS promueve una mayor expresión del gen bajo la secuencia UAS cuanto más elevada sea la temperatura. De manera consistente con este hecho, los fenotipos son en general más frecuentes y más acusados a 29°C que a 25°C, y éstos más que a 18°C (No mostrado). Igualmente, las combinaciones de Gal4-UAS que expresan mayores niveles de *Ubx* son las que producen las transformaciones más fuertes. Ambos resultados parecen indicar que el fenómeno es sensible a los niveles de *Ubx* presentes en las células.

rA2. Las transformaciones de halterio en ala son debidas a la falta de la proteína Ubx

Nuestros experimentos ponen de manifiesto un fenómeno sorprendente al conseguir transformaciones de halterio en ala (y en general de T3 en T2) no por pérdida de función de *Ubx* sino por ganancia. Para discernir si dichas transformaciones se deben a una falta de proteína Ubx, o bien a una incapacidad para realizar sus funciones al encontrarse en concentraciones elevadas, realizamos tinciones inmunohistoquímicas en discos imaginales de halterio en individuos UAS-GFP; *MS372-GAL4/ UAS-Ubx (SG1)*, al ser éste uno de los genotipos en los que se observaron mayores transformaciones en adultos. Los resultados muestran cómo la proteína Ubx, visualizada mediante un anticuerpo que la reconoce específicamente, desaparece por completo de grandes regiones del disco de halterio (Fig. R2B, B'', C y C'', comparar con silvestre en Fig. R2A), lo cual pone de manifiesto un mecanismo mediante el cual *Ubx* es capaz o bien de inhibir su propia síntesis, o bien de reducir la estabilidad de la proteína de manera que no puede ser detectada en los discos.

Realizamos un estudio más detallado de estos discos en los que se coexpresan *Ubx* y GFP bajo el control de la línea *MS372-Gal4*, empleando en algunos casos una línea *UAS-Ubx-HA* (Fig. R2C, C''), en la cual un epítipo de hemaglutinina está fusionado a la proteína Ubx (Ronshaugen et al., 2002). Mediante el empleo de un anticuerpo específico para este epítipo pudimos distinguir el producto Ubx exógeno. Estos experimentos revelan cuatro tipos de poblaciones celulares distintas (Fig. R2B, B'): a) células "silvestres", en las que no se expresa la proteína Gal4, visualizadas por la ausencia de GFP, y en las que, consecuentemente, los niveles de Ubx detectados son normales; b) células en las que se expresa la proteína Gal4, por lo tanto marcadas por GFP, en las que los niveles de Ubx están elevados respecto al silvestre (Fig. R2B'', flecha, comparar con 2A). Esta mayor acumulación de Ubx se debe a la presencia de gran cantidad de proteína exógena (Figs. R2C, C'', flecha). c) células en las que no hay expresión de la proteína Gal4 (sin GFP) pero tampoco señal de Ubx (Fig. R2B', B'', líneas continuas), lo cual implica que o bien la inhibición de *Ubx* se produce por un efecto no autónomo celular, o está acompañada de la inhibición posterior de la proteína Gal4, o es un fenómeno permanente en el tiempo incluso después de que cesen las condiciones que lo originaron; es decir, que éstas células son descendientes de aquellas donde alguna vez se expresó la proteína Gal4 y se inactivó *Ubx*, y que guardan una memoria de este fenómeno aún después de que la proteína Gal4 deje de expresarse en ellas. Este modelo implica una represión de *Ubx*

dependiente de la proteína Ubx pero mantenida en el tiempo independientemente de la misma, ya que no presentan tinción alguna para Ubx. d) Por último, hay células que tienen expresión del Gal4 (GFP+) pero no de Ubx ni tampoco de hemaglutinina, que detecta específicamente el Ubx exógeno (Figs. R2B',B'', línea discontinua). Esto podría indicar que la proteína GFP tiene una vida media mayor que la de la proteína Ubx, y perdura más tiempo en las células, siendo detectada a bajos niveles aún cuando no queda ya proteína Ubx. También podría sugerir que la inhibición de la síntesis de proteína homeótica ocurre a nivel de mRNA o a nivel de traducción, donde tanto el producto exógeno como endógeno son procesados de manera idéntica.

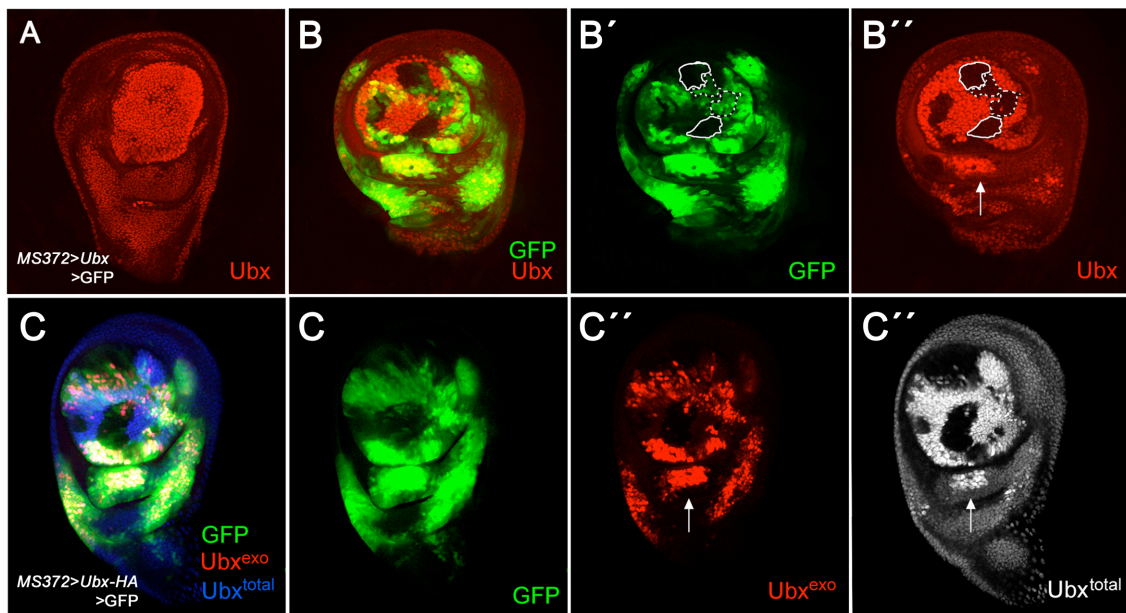


Figura R2. La expresión ectópica de Ubx en los discos imaginales de halterio bloquea la síntesis endógena de la proteína.

(A) Disco de halterio mostrando la expresión silvestre de Ubx. (B-B'') Disco de halterio UAS-GFP; *MS372-Gal4 UAS-Ubx* (SG1), en el que se muestra cómo desaparece la proteína Ubx de regiones del disco (rojo en B''), a veces incluso de manera independiente de la presencia o ausencia de la expresión de GFP, en verde, dirigida por la línea Gal4 (líneas discontinua y continua respectivamente) (B y B'). (C-C''') Disco de halterio UAS-GFP; *MS372-Gal4 UAS-Ubx-HA*, en el que se muestra la expresión exógena de Ubx (rojo en C''), frente a la detección de la proteína total (azul en C, gris en C'''). La expresión de GFP está en verde en C'.

El análisis detallado de la Figura 2 indica que Ubx no inhibe la expresión de la línea Gal4, al detectarse GFP en un elevado número de células. Para comprobar mejor este hecho y si, aunque no de manera completa pero sí de manera parcial, pudiese verse alterado el patrón de expresión de las líneas Gal4 al sobreexpresar *Ubx*, decidimos comparar los patrones de expresión de varias líneas Gal4 al sobreexpresar *Ubx* y en condiciones silvestres (Fig. R3) Para ello sobreexpresamos la línea UAS-*Ubx* (SG1) conjuntamente con una copia de UAS-GFP bajo el control de las líneas *MS372-Gal4*, *dpp-Gal4* y *ptc-Gal4* (Figs. R3A', A'', B' y C' respectivamente). En todos los casos se observó represión de *Ubx* (no mostrado). Sin embargo, no se encontraron alteraciones apreciables en el patrón de

expresión de GFP entre los discos imaginales de halterio que expresaban *Ubx* y los que no (Fig. R3A', A'' comparar con A, B' comparar con B, C' comparar con C). Esto sugiere que el fenómeno de represión de *Ubx* no está acompañado de una represión de la proteína Gal4 que lo sobreexpresa. La existencia de grupos de células en los que no se detecta *Ubx* ni GFP (Fig 2B-C'') deberá explicarse por tanto por un mecanismo no autónomo o de perdurancia de la situación de inhibición, como se comentó anteriormente.

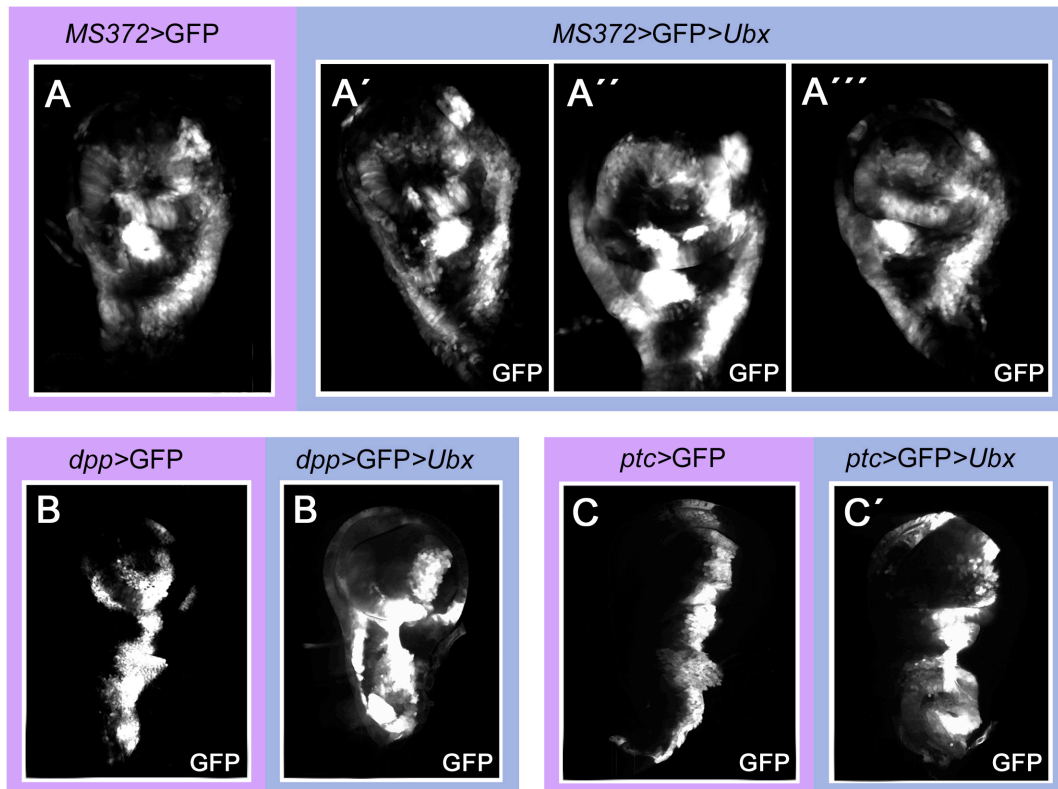


Figura R3. Patrones de expresión de GFP dirigidos por diferentes líneas Gal4 en discos imaginales de larvas de tercer estadio.

(A) *MS372-Gal4 UAS-GFP*. (A'-A''') *MS372-Gal4 UAS-GFP UAS-Ubx* (SG1). (B) *dpp-Gal4 UAS-GFP*. (B') *dpp-Gal4 UAS-GFP UAS-Ubx* (SG1). (C) *ptc-Gal4 UAS-GFP*. (C') *ptc-Gal4 UAS-GFP UAS-Ubx* (SG1). La comparación entre los discos A'-A''' con A, B' con B y C' con C, muestra cómo la sobreexpresión de *Ubx* no afecta al patrón de expresión de las líneas Gal4.

rA3. La inhibición de la expresión de *Ubx* se debe a una represión de la transcripción

Los fenotipos de transformación de halterio en ala causados por la sobreexpresión de *Ubx* son consistentes con la observación de la desaparición de la proteína de grandes regiones del disco imaginal de halterio. Sin embargo, queda aún por identificar el nivel al cual se bloquea la síntesis de la proteína *Ubx*, ya que puede tratarse de un mecanismo de silenciamiento génico a nivel de DNA, de degradación del mensajero, de la proteína, o un bloqueo de la traducción.

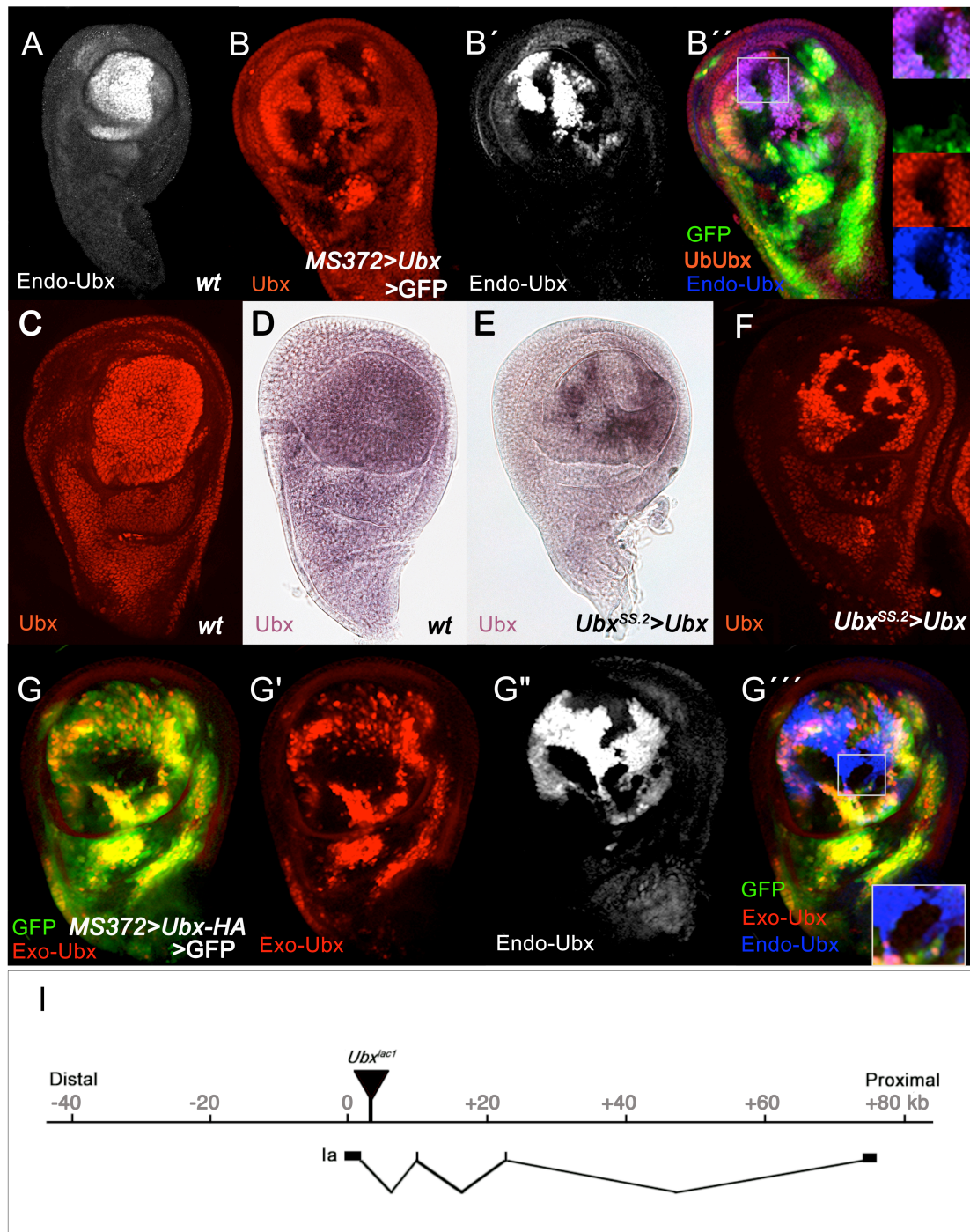


Figura R4. Niveles elevados de *Ubx* provocan una parada de la transcripción del gen endógeno (a).

(A) Patrón de expresión de la línea *Ubx^{lac1}* en un individuo silvestre. La sobreexpresión de *Ubx* en moscas *MS372-Gal4/UAS-Ubx(SG1) Ubx^{lac1}* (B-B'') ocasiona la pérdida la proteína Ubx total en grandes regiones del disco (B, B'' comparar con C) y también la ausencia de β -galactosidasa de esas mismas células (B', B''), sugiriendo que la transcripción podría estar bloqueada. Un detalle de expresión en B'' se muestra como recuadros a su derecha. La visualización del RNAm de *Ubx* en moscas *Ubx-Gal4^{SS.2}/UAS-Ubx(SG1)* muestra grandes grupos de células en los que no hay transcrito de *Ubx* (E comparar con la transcripción en un disco silvestre en D), de manera similar a lo que ocurre con la proteína total (F comparar con C). (G-G''') Disco de halterio de una larva *UAS-Ubx-HA/+ ; MS372-Gal4/ UAS-Ubx(SG1) Ubx^{lac1}* donde se puede apreciar cómo hay grupos de células donde no hay expresión del producto *Ubx*

endógeno (gris en G'', azul en G''') ni del exógeno (rojo en G') (ver recuadro). (I) Localización del elemento *Ubx^{lac1}* en el primer intrón de *Ubx* (Casares et al., 1997).

Para intentar discernir entre estas posibilidades generamos moscas UASGFP; *MS372-Gal4/UAS-Ubx(SG1) Ubx^{lac1}*. *Ubx^{lac1}* es un elemento P localizado en el primer intron del gen *Ubx* (Fig. R4I), y que reproduce el patrón de expresión de dicho gen en el compartimento anterior del halterio y con menor intensidad en el posterior (Fig. R4A, comparar con la tinción de la proteína *Ubx* en 4C) (Casares et al., 1997). Puesto que el procesamiento postranscripcional de la proteína β -galactosidasa y de *Ubx* son diferentes e independientes, la visualización de la proteína β -galactosidasa mediante tinciones inmunohistoquímicas refleja exclusivamente el estado transcripcional de *Ubx* en cada célula del disco imaginal de halterio. En los individuos mutantes generados se observa cómo se inhibe la síntesis de β -galactosidasa en las mismas células en las que no hay proteína *Ubx* (Figs. R4B,B''), reforzando la idea de que la desaparición de la proteína homeótica se produce por inhibición de su transcripción como respuesta de sus secuencias reguladoras ante la situación de sobreexpresión. Para confirmar esta idea, realizamos hibridaciones in situ para visualizar el mRNA de *Ubx* en discos imaginales de halterio del genotipo *Ubx-Gal4^{SS.2}/UAS-Ubx* (Fig. R4E comparar con silvestre en 4D). Los niveles de mRNA observados disminuyen de una manera similar a la proteína *Ubx* en discos del mismo genotipo (Fig. R4E comparar con 4F), confirmando que la ausencia de proteína *Ubx* en las condiciones descritas anteriormente se debe a una inhibición de la transcripción.

A pesar de esto, la visualización conjunta del *Ubx* endógeno y exógeno en moscas del genotipo *UAS-Ubx-HA/+; MS372-GAL4/UAS-Ubx(SG1) Ubx^{lac1}* (Fig. 4G-G'''), muestra cómo no todas las células que expresan *Ubx* exógeno disminuyen los niveles de expresión de β -galactosidasa. Esta observación podría explicarse de diferentes maneras: podría ser que la gran perdurancia de la proteína β -gal permitiese su visualización incluso cuando ya no está siendo transcrita, podría ser que la capacidad de *Ubx* de autoinhibir su propia síntesis ocurriera sólo en estadios anteriores al visualizado, o podría también ocurrir que la parada de la transcripción requiriese elevados niveles de *Ubx* mantenidos durante un tiempo determinado, no siendo este el caso en las células visualizadas. Aparte de esto, son claramente apreciables grupos de células en los que no hay proteína *Ubx* endógena ni exógena (cuadro en Fig. R4G'''), como ya se describió en la figura 2. Una posible explicación de este fenómeno sería que estas células derivan de células que expresaron la línea *Gal4* con anterioridad sólo transitoriamente, de manera que ni GFP ni *Ubx* están presentes en el momento que se fija el disco, y en las cuales o bien la expresión del *Ubx* endógeno no ha empezado de nuevo, o bien el bloqueo de la transcripción se hace permanente.

rA4. El aumento transitorio de los niveles de *Ubx* provoca la ausencia permanente de proteína *Ubx*.

La hipótesis antes señalada se ve reforzada al analizar los resultados obtenidos con el sistema Gal4/Gal80^{ts}, que permite controlar temporalmente la actividad de las líneas Gal4 (Mcguire et al., 2003). La proteína Gal80^{ts} inhibe a la proteína Gal4, pero al ser sensible a temperatura sólo es funcional a 17°C, mientras que a 29°C es inactiva. Por ello, las moscas crecidas a 17°C no tienen expresión alguna de la proteína Gal4, a diferencia de lo que ocurre a 29°C, en la que la línea Gal4 dirige la expresión de *Ubx* y provoca los efectos antes descritos (esquema Fig. R4).

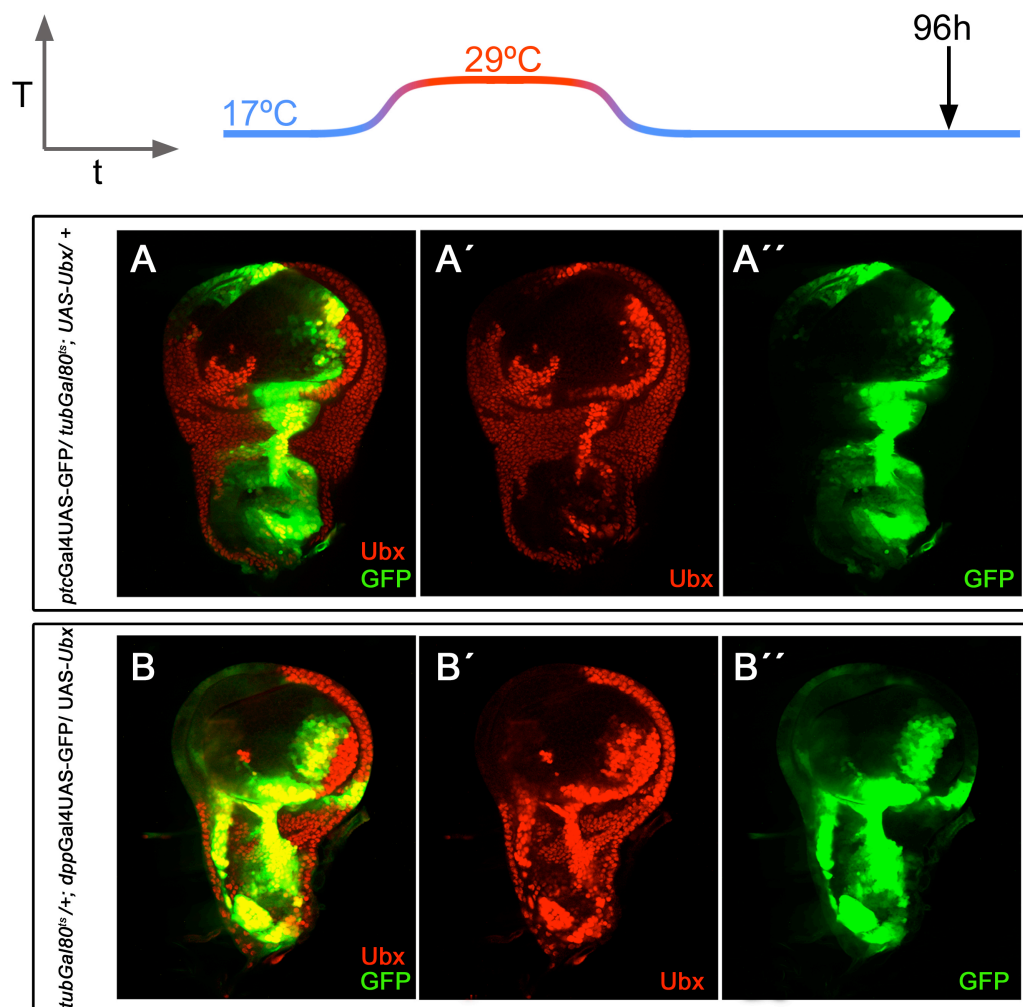


Figura R5. La expresión transitoria de *Ubx* exógeno resulta en la falta permanente de proteína *Ubx* (a).

La expresión transitoria de *Ubx* en larvas *ptc*-Gal4 UAS-GFP/*tub*-Gal80^{ts}; UAS-*Ubx*/+ (A - A'') y *tub*-Gal80^{ts}/+; *dpp*-Gal4 UAS-GFP/UAS-*Ubx* (B-B''), sometidas a un protocolo estándar de cambios de temperatura, provoca la pérdida de Ubx (rojo en A, A' y B, B') en grandes regiones del disco de halterio, más allá del dominio de expresión de ambas líneas Gal4 (GFP en verde en A, A'', B, B') en el tercer estadio larvario.

Las moscas de genotipo *ptc-Gal4 UAS-GFP/tub-Gal80^{ts}; UAS-Ubx (SG1)/ +* (Fig. R5A - A'') y *tub-Gal80^{ts}/+; dpp-Gal4 UAS-GFP/UAS-Ubx* (Fig. R5B-B'') fueron sometidas a un protocolo de cambios de temperatura que permitió la expresión de *Ubx* en los dominios *patched (ptc)* y *decapentaplegic (dpp)* respectivamente, únicamente durante los primeros días del desarrollo larvario (esquema Fig. R5). En discos de halterio de moscas sometidas a este tratamiento se puede observar cómo la proteína *Ubx* está ausente de grandes regiones de los compartimentos anteriores de los discos (Fig. R5A-B''). La posible explicación de este resultado la encontramos en los patrones espaciotemporales de expresión de estas dos líneas *Gal4*. En el tercer estadio larvario la expresión de estas dos líneas puede considerarse similar en los discos de ala y halterio y consiste en una banda de células del compartimento anterior a lo largo del borde anteroposterior (*GFP* en Fig. 5 A,A'' y B,B'' y Fig. R6C). Sin embargo, se ha descrito que en el disco de ala este patrón es dinámico temporalmente, siendo mucho más amplio en estadios más tempranos (Weigmann y Cohen, Fig. R6A-C). De esta manera, células del compartimento anterior distantes del borde A/P no expresan la proteína *Gal4* en el estadio de larva 3 tardía, cuando las larvas son disecionadas, pero descenden de células que sí lo expresaron en estadios anteriores de larva 1 y 2 (Fig. R6C,D). Esta población de células es muy similar a los patrones de pérdida de *Ubx* que observamos en discos de halterio de las moscas anteriormente descritas (Fig. R6E comparar con C y D). Este hecho parece indicar que, suponiendo que el patrón temporal de expresión de las líneas *Gal4* sea también similar entre los discos de ala y halterio, la proteína *Ubx* desaparece de casi todas las células que descenden de aquellas en las que se expresó más tempranamente, lejos del borde A/P, y por lo tanto parece apoyar la hipótesis de que una expresión transitoria de *Ubx* resulta en un bloqueo prolongado de la expresión de dicho gen.

Para comprobar definitivamente esta hipótesis y evitar los problemas derivados de usar líneas *Gal4* con expresiones variables, decidimos utilizar una línea de patrón espacial conocido y constante en el tiempo que pudiésemos activar o desactivar mediante el empleo de la proteína *Gal80^{ts}*. Para este fin elegimos la línea *apterous-Gal4 (ap-Gal4)* (Calleja et al., 1996), en la cual se expresa la proteína *Gal4* bajo el control del gen selector *apterous (ap)*, el cual se transcribe en las células de los compartimentos dorsales de los discos de ala y halterio (Cohen et al., 1992; Fig. R7A-A').

A diferencia de las líneas *Gal4* usadas con anterioridad, cuando se expresa la proteína *Ubx* bajo el control de la línea *ap-Gal4* no se producen transformaciones del halterio en ala en individuos adultos, sino reducciones en el tamaño del halterio, más acusadas cuanto mayor sea la temperatura a la que se desarrollan las moscas. Ya fue previamente descrito que el aporte continuo de proteína *Ubx* a niveles mayores a los silvestres en una región amplia del disco resulta en una reducción del tamaño de dicha región (Smolik-Utlaut, 1990). En nuestro caso, dicha reducción del tamaño en el compartimento dorsal es patente en moscas del genotipo *ap-Gal4/+; UAS-Ubx/Ubx^{lac1}* (Fig. R7B, B'), pero es aún más fácilmente observable en discos de genotipo *ap-Gal4/*

UAS-*Ubx*-HA (Fig. R7C-C''), dado que esta línea promueve una mayor expresión que la línea UAS-*Ubx* (SG1) empleada en los experimentos anteriores (comparar con Fig. R7B'). En el adulto también se observa una reducción de tamaño en el halterio (Fig. R8E)

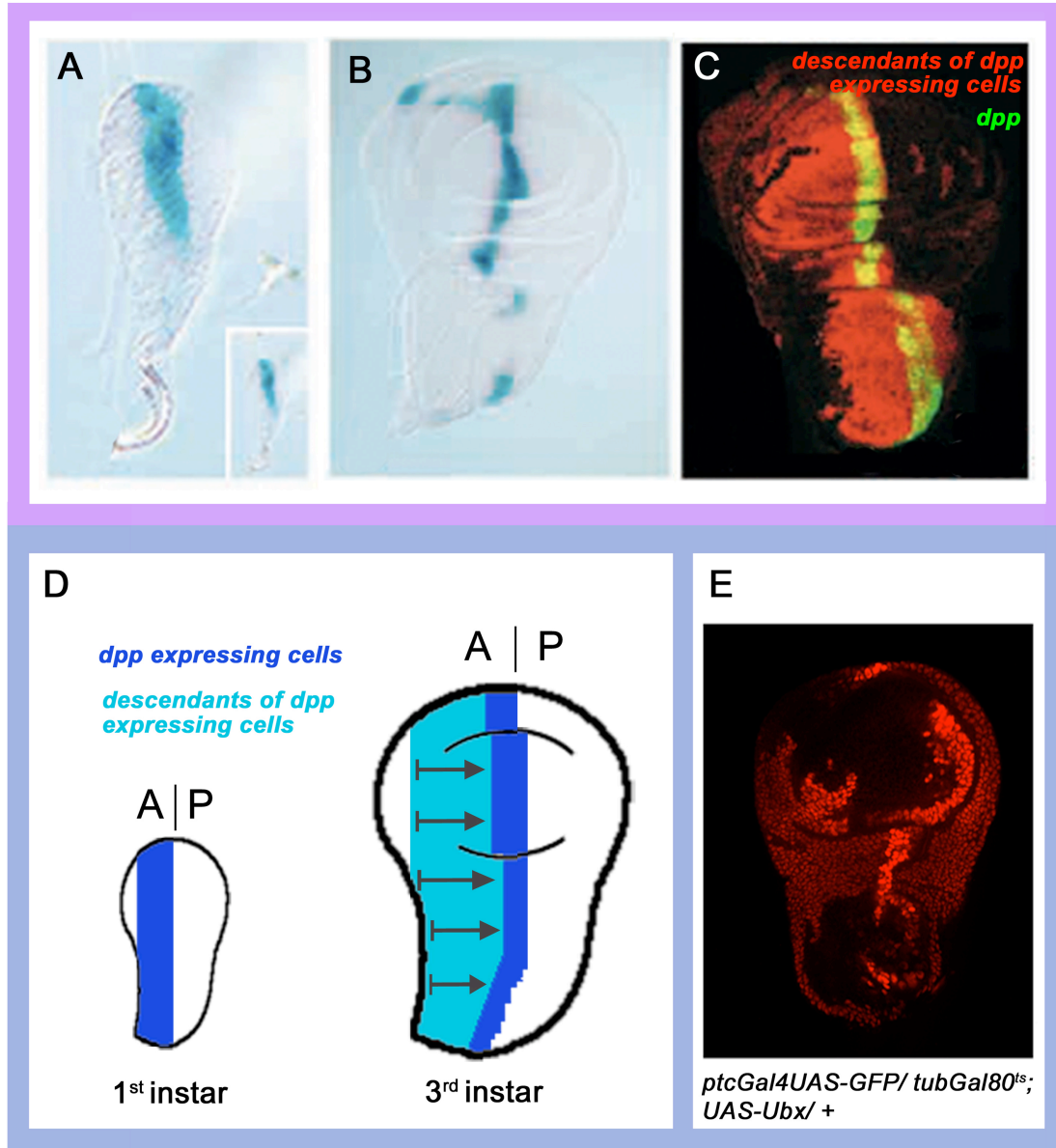


Figura R6. La expresión transitoria de *Ubx* exógeno resulta en la falta permanente de proteína *Ubx* (b).

La expresión de *dpp* (visualizada con una construcción *dpp*-Gal4) varía espacio-temporalmente (A-C), abarcando una gran parte del "pouch" en estadios tempranos del desarrollo y tan sólo una estrecha fila de células en el tercer estadio larvario (B) (Tomado de Weigmann y Cohen, 1999). Experimentos de marcación de linaje muestran cómo en dicho estadio, una amplia banda de células que cubre la totalidad del "pouch" y gran parte del notum no expresa la línea *dpp*-Gal4 (verde en C, azul oscuro en D) pero sí la expresó en estadios anteriores (rojo en C, azul claro en D). Al sobreexpresar *Ubx* con dicha línea, desaparece de un grupo de células similares a las anteriores, mostrando cómo la expresión transitoria de la proteína homeótica provoca una falta permanente de la proteína endógena en las células descendientes.

Sin embargo, consistentemente con lo descrito previamente, la sobreexpresión permanente de *Ubx* con *ap-Gal4* en moscas del genotipo *ap-Gal4/+; UAS-Ubx/Ubx^{lac1}* es capaz de inhibir la transcripción del gen *Ubx* endógeno, monitorizada como proteína β -gal sintetizada a partir del inserto *Ubx^{lac1}* (Fig7 B''', comparar con 7A'''), y que también visualizamos mediante hibridación *in situ* (dato no mostrado).

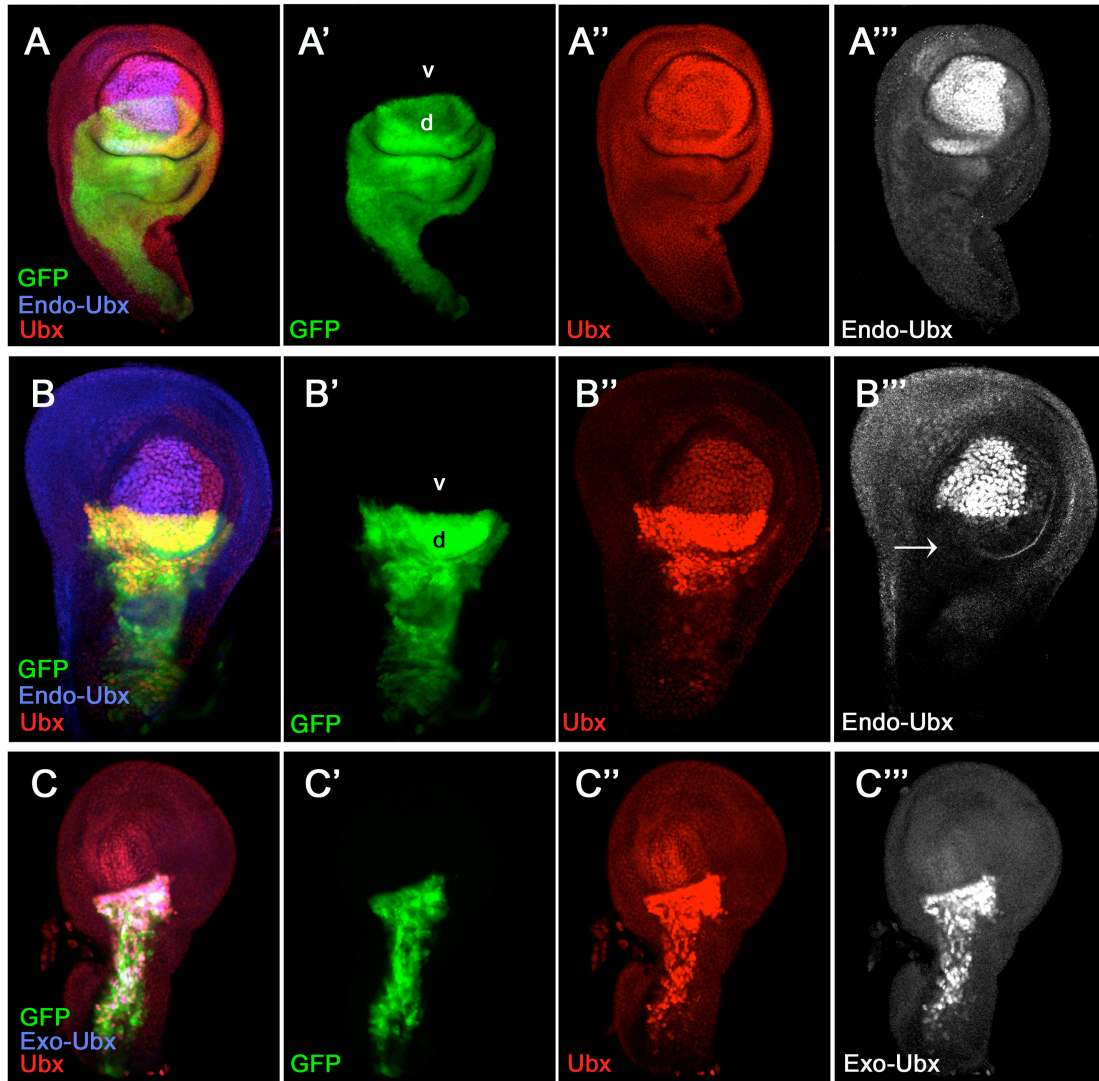


Figura R7. Niveles elevados de *Ubx* provocan una parada de la transcripción del gen endógeno (b).

(A-A''') Expresión de la línea *ap-Gal4* UASGFP en un disco de halterio silvestre (A,A'). (A''). Expresión de *Ubx* (rojo) en ese mismo disco. (A''') Expresión de la inserción *Ubx^{lac1}* (gris). (B-B''') Disco de halterio de larvas *ap-Gal4/+; UAS-Ubx/Ubx^{lac1}*. Se puede apreciar cómo niveles elevados de proteína *Ubx* en el compartimento dorsal (B,B', en rojo) provocan un bloqueo de la expresión de la inserción *Ubx^{lac1}* (B, B''', azul en B, gris en B'''). (C-C''') Disco de halterio de larvas *ap-Gal4/UAS-Ubx-HA; Ubx^{lac1}/+*. Se puede apreciar cómo los niveles elevados de proteína *Ubx* total(rojo en C, C'') en el compartimento dorsal se deben al acúmulo provocado por el *Ubx* exógeno (azul en C, gris en C''').

La elevada tinción de la proteína Ubx en el compartimento dorsal (Fig. R7B'' comparar con 7A'') se debe a la enorme cantidad de proteína exógena suministrada por la línea Gal4, monitorizada mediante la línea UAS-Ubx-HA (Fig. R7C''' comparar con C'' y B''). Por esto, podemos concluir que la razón por la que no se encuentran transformaciones de halterio en ala en adultos de estos genotipos es debido a la presencia constante de la proteína Ubx exógena, que enmascara la represión de la transcripción del gen *Ubx* endógeno y compensa funcionalmente la falta de la proteína endógena.

Para estudiar si la inhibición de la síntesis de *Ubx* era capaz de mantenerse incluso al cesar la sobreexpresión del producto exógeno generamos moscas con el siguiente genotipo: *ap-Gal4* UASGFP; UAS-Ubx(SG1) *Ubx^{lac1}/tubGal80^{ts}* y activamos e inactivamos la expresión de la proteína Ubx exógena mediante cambios de temperatura.

En el experimento diseñado, las moscas pasaron su fase embrionaria a 17°C, después fueron transferidas a 29°C durante un tiempo de 24h o 48h, y finalmente fueron pasadas de nuevo a 17°C durante el desarrollo larvario y diseccionadas en estadio de larva 3, lo cual ocurre a diferentes tiempos tras el cambio de temperatura en función del individuo y del tiempo pasado a 29°C (24h o 48h) (Esquema en Fig. R8). A este protocolo de cambios de temperatura nos referiremos de aquí en adelante como protocolo estándar. Mediante este protocolo, el gen *Ubx* exógeno se expresa bajo el control de *ap-Gal4* todo el tiempo que los individuos están a 29° C, tiempo durante el cual presumiblemente se inhibe la transcripción del gen *Ubx* endógeno. Tras el cambio de temperatura cesa la expresión de la proteína Ubx exógena, al bloquearse la actividad del Gal4 debido a la expresión ubicua de la proteína Gal80^{ts}. De esta forma, proporcionamos una expresión transitoria de la proteína exógena, y observamos los efectos sobre la transcripción del gen endógeno.

Los resultados muestran tres efectos claros: en primer lugar, se observa que la proteína *Ubx* total, aunque de origen mayoritariamente exógeno (Fig. R7B,B'', C-C'''), es detectable en las células del compartimento dorsal del halterio hasta algo más de 48 horas después del cambio de temperatura (datos no mostrados), pero decae progresivamente. Esto se debe al tiempo que tarda en producirse la inhibición de la proteína Gal4 por la proteína Gal80^{ts} (McGuire 2003), y al tiempo requerido para la degradación de la proteína Ubx exógena sintetizada con anterioridad al cambio de temperatura. De la misma manera, también se observa un decaimiento temporal en los niveles de GFP, dato éste que demuestra que la proteína Gal4 se encuentra ya inactivada, siendo esta proteína más estable que Ubx y, por lo tanto, detectable más tiempo después del cambio de temperatura (Fig. R8B). En segundo lugar, la expresión de *Ubx* endógeno no vuelve a restablecerse independientemente del tiempo transcurrido a 17°C tras los cambios de temperatura y antes de la disección; a partir de las 72 horas no se detecta proteína Ubx en el compartimento dorsal de los discos de halterio de ninguna larva (Fig. R8C-D'). De la misma manera, la transcripción de *Ubx*, monitorizada por el inserto *Ubx^{lac1}* y visualizada mediante hibridación in situ (datos no mostrados),

que se inhibiría durante la fase de sobreexpresión del gen *Ubx* exógeno (Fig. R7B''), se mantiene reprimida y no se vuelve a recuperar incluso hasta 7 días después del cambio (Fig.8 B'',C'',D''). Por último, consistentemente con el hecho de que las células no vuelvan a expresar *Ubx* durante el resto del desarrollo, los halterios de las moscas adultas muestran una transformación fuerte hacia ala, tanto en términos de diferenciación como de tamaño (Comparar Fig. R8F con 8E, en la que se muestra un halterio donde la expresión de *Ubx* se mantiene constante en el desarrollo). Esta diferencia de tamaño ya es apreciable en los compartimentos dorsales en los discos en el momento de la disección (Fig. R8B-D').

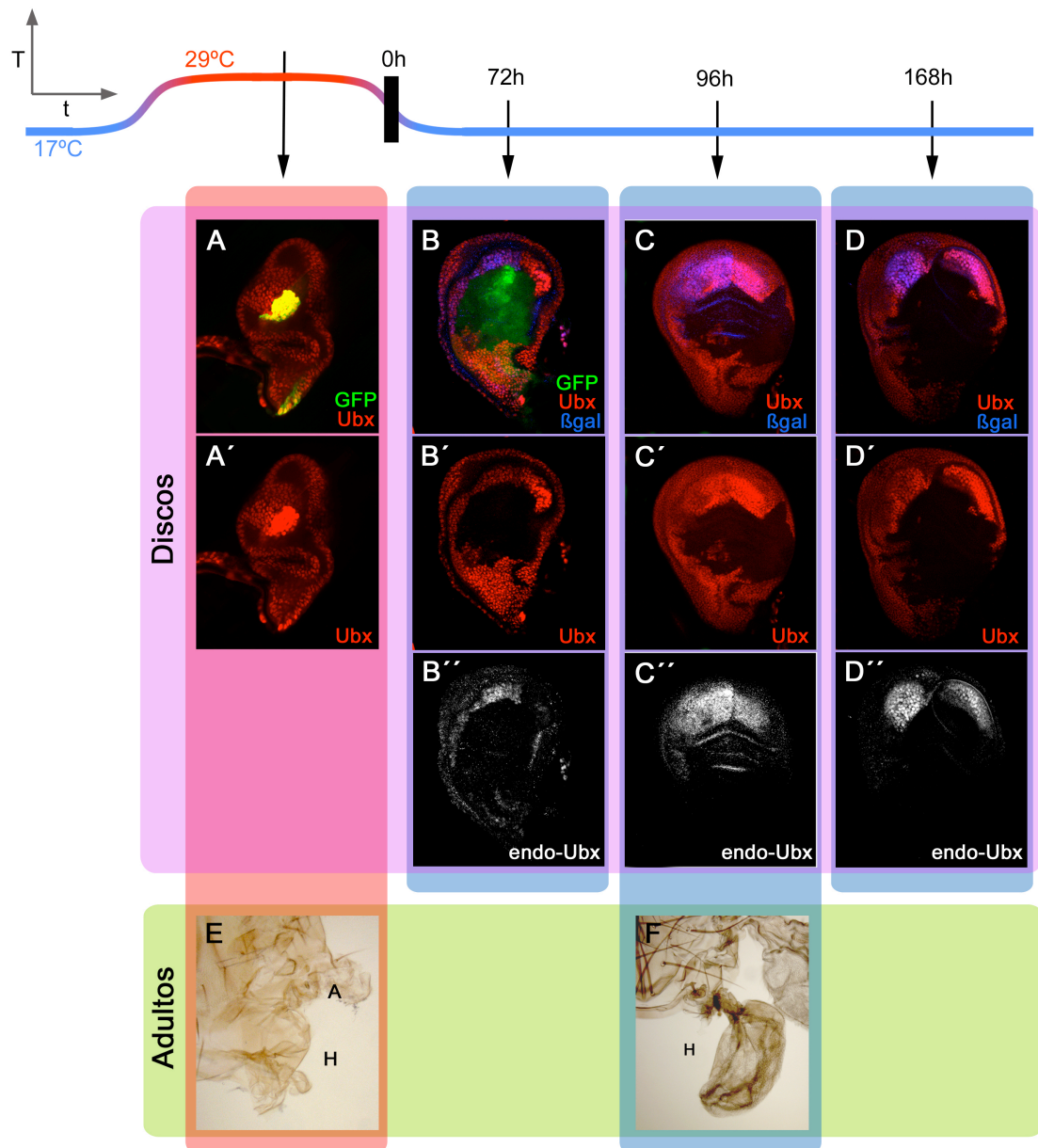


Figura R8. La expresión transitoria de *Ubx* exógeno resulta en la falta permanente de proteína *Ubx* (c).

La sobreexpresión permanente de *Ubx* en larvas *ap-Gal4/+; UAS-Ubx/+* produce discos de halterio con niveles elevados de proteína *Ubx* en el compartimento dorsal, el cual presenta un tamaño reducido en

el disco (A-A') y en el adulto (E). Si la sobreexpresión es transitoria (B-D''), gracias a someter a las larvas con genotipo *ap-Gal4/+; UAS-Ubx/tub-Gal80^{ts}* a un protocolo estándar de cambios de temperatura, la transcripción de *Ubx* no vuelve a recuperarse en el compartimento dorsal (gris en B'', C'', D'') ni vuelve por tanto a acumularse proteína Ubx en dichas células (rojo en B', C', D'), incluso aunque hayan transcurrido 7 días tras el cese de las condiciones de sobreexpresión (D-D''). Debido a que dichas células se desarrollan en ausencia de *Ubx*, se diferencian como células de ala, produciendo transformaciones del compartimento dorsal del halterio en ala (F). Un esquema del procedimiento empleado y las horas a las que se realizó la disección de discos se indica en la parte superior.

Tomando en conjunto estos resultados, consideramos que el tiempo transcurrido tras el último cambio de temperatura es ampliamente suficiente como para que la situación de inhibición hubiera podido revertirse y el gen *Ubx* endógeno se expresara de nuevo, y que si no ocurre tal se debe a que el mecanismo de bloqueo de la transcripción es permanente y heredable de células madres a hijas, ya que en los 5 días en que no hay expresión de *Ubx* han transcurrido varias rondas de división celular.

Además, estos resultados constituyen una explicación posible a la cuestión de por qué sólo algunas líneas Gal4 son capaces de inducir transformaciones de halterio en ala: para la generación de estos fenotipos es imprescindible una expresión transitoria de *Ubx* exógeno que aumente los niveles de *Ubx* en las células lo suficiente como para bloquear completamente la transcripción del gen endógeno, pero que después no continúe expresándose en dichas células, para que la ausencia permanente de síntesis de proteína Ubx pueda ponerse de manifiesto y generar los fenotipos. Por ello, sólo aquellas líneas Gal4 con una expresión fuerte pero variable temporalmente, como *dpp-Gal4*, *ptc-Gal4* o *MS372-Gal4* entre otras, son capaces de inducir transformaciones, mientras que aquellas con un patrón de expresión invariable en el tiempo, tales como *ap-Gal4*, no.

rA5. La síntesis de *Ubx* puede reiniciarse tras una ausencia del producto homeótico.

Aunque los resultados anteriores apoyan las conclusiones propuestas, quisimos excluir la posibilidad de que la ausencia permanente de proteína Ubx fuera debida a que la transcripción del gen endógeno necesitase un tiempo excepcionalmente largo para volver a activarse. Para ello decidimos comparar la expresión de *Ubx* tras el protocolo estándar, en discos de halterio que expresaron la línea *UAS-dsUbx* (Monier et al 2005), que al ser expresada dispara en las células un mecanismo de RNA de interferencia que degrada el mRNA de *Ubx* de manera específica (y por lo tanto también provoca la desaparición de la proteína), con los experimentos de sobreexpresión que realizamos en los experimentos anteriores.

Moscas de genotipo *ap-Gal4/+; tub-Gal80^{ts}/UAS-dsUbx* que fueron crecidos a 29°C permanentemente hasta el tiempo de su disección (Fig. R9A,A') muestran cómo no hay proteína Ubx detectable en el compartimento dorsal mientras que se expresa *dsUbx*. Sin embargo, cuando aplicamos a las moscas del mismo genotipo un protocolo estándar idéntico al que empleamos para

moscas en las que se sobreexpresaba *Ubx* (Fig. R8), el resultado es el opuesto: mientras que los niveles de proteína GFP decaen de manera similar (Fig. R8B, C), la expresión de *Ubx* se restablece, siendo los niveles de proteína detectables mediante una tinción inmunohistoquímica a partir de las 72 horas (Fig. R8B' y C', comparar con 8E y F respectivamente).

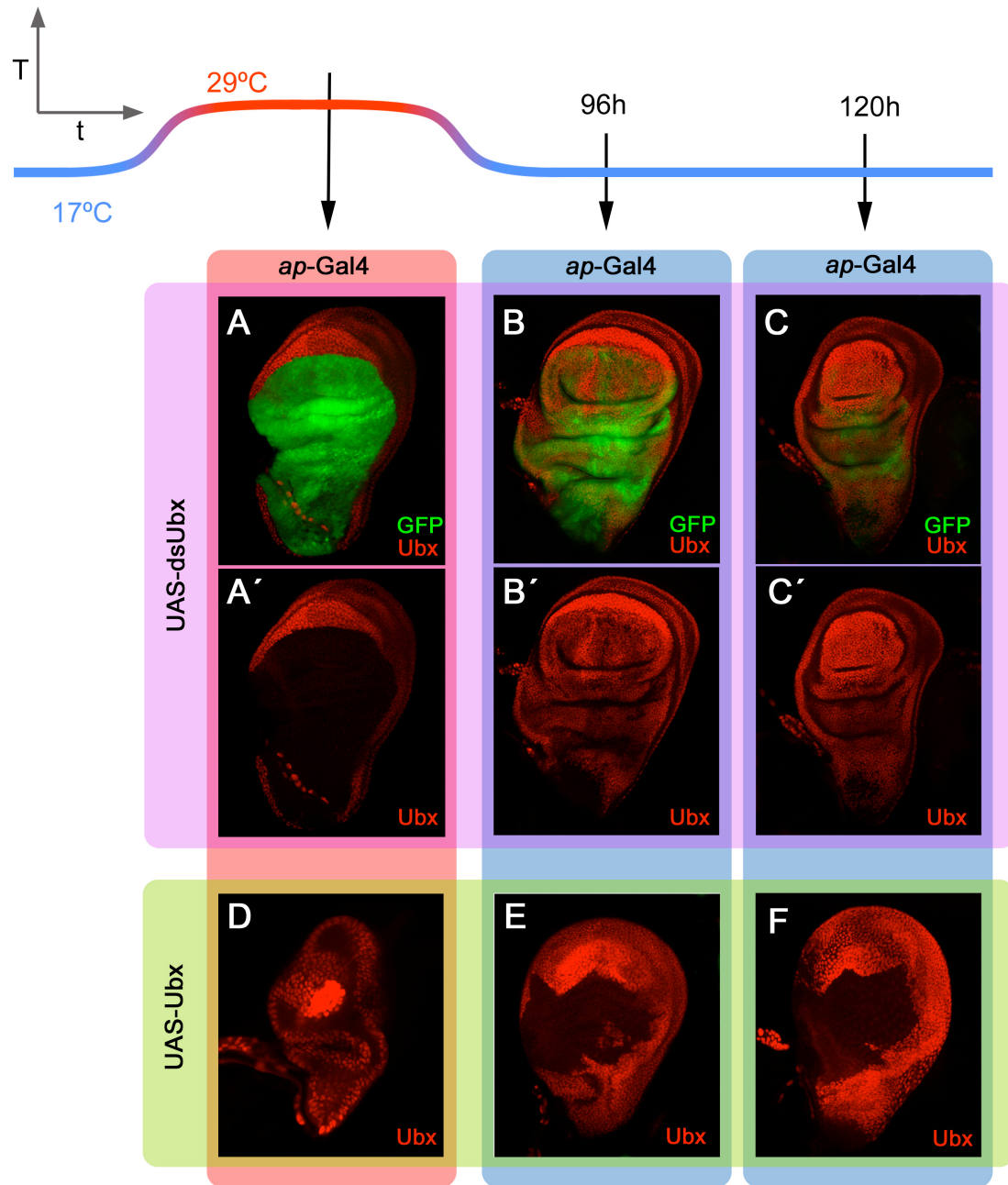


Figura R9. La proteína Ubx vuelve a ser detectable tras la degradación del transcrito por un mecanismo de RNA de interferencia.

La degradación del RNA mensajero de *Ubx* en moscas *ap-Gal4/+; tub-Gal80^{ts}/UAS-dsUbx Df109* crecidas permanentemente a 29°C resulta en una ausencia de la proteína Ubx en las células del disco de halterio (A,A'). Al cambiar las moscas a la temperatura restrictiva, cesa la degradación del mensajero, se reanuda la traducción del mismo, y la proteína Ubx vuelve a acumularse en las células, siendo claramente detectable a partir de las 72-96h desde el cambio de temperatura (B-C'), al contrario de lo que ocurre cuando se sobreexpresa *Ubx* siguiendo el mismo régimen de cambios de temperatura en moscas *ap-Gal4 UASGFP; UAS-Ubx(SG1)/tub-Gal80^{ts}* (D-F'). Esto demuestra que la mera ausencia de *Ubx* no es

suficiente para promover su silenciamiento permanente, y que debe existir un mecanismo específico dependiente del bloqueo de la transcripción para que seta pueda ser permanentemente bloqueada. Como en la figura anterior, el esquema del experimento se muestra en la parte superior.

Estos resultados demuestran cómo la ausencia del restablecimiento de la expresión de *Ubx* se produce no por la pérdida de la propia proteína *Ubx*, como ocurre al expresar la línea *UAS-dsUbx*, sino por la parada permanente de su transcripción, ocasionada al expresar el gen *Ubx* exógeno de forma transitoria.

rA6. La represión de *Ubx* se mantiene de forma autónoma celular.

Para estudiar si el silenciamiento permanente de *Ubx* era estrictamente autónomo celular, diseñamos un experimento en el cual, mediante un protocolo estándar de cambios de temperatura, sobreexpresáramos *Ubx* transitoriamente dentro de un grupo de células perfectamente definido y marcado durante todo el desarrollo de manera independiente a la expresión de la proteína Gal4. Esto lo conseguimos en moscas del genotipo *y w hs-flp; UAS-UbxHA/tub-Gal80^{ts}; Ubx^{lac1}/tub>GFP>Gal4*. En estos individuos, mediante un choque térmico indujimos clones al principio del desarrollo larvario, quedando éstos marcados por la pérdida de GFP todo el resto del desarrollo. En estos clones sobreexpresamos *Ubx* exógeno transitoriamente de acuerdo al protocolo estándar, tiempo durante el cual los altos niveles de proteína *Ubx* inhiben la síntesis de proteína endógena y estudiamos la presencia de proteína total y endógena varios días después de transferir las larvas a la temperatura restrictiva (Fig. R10A).

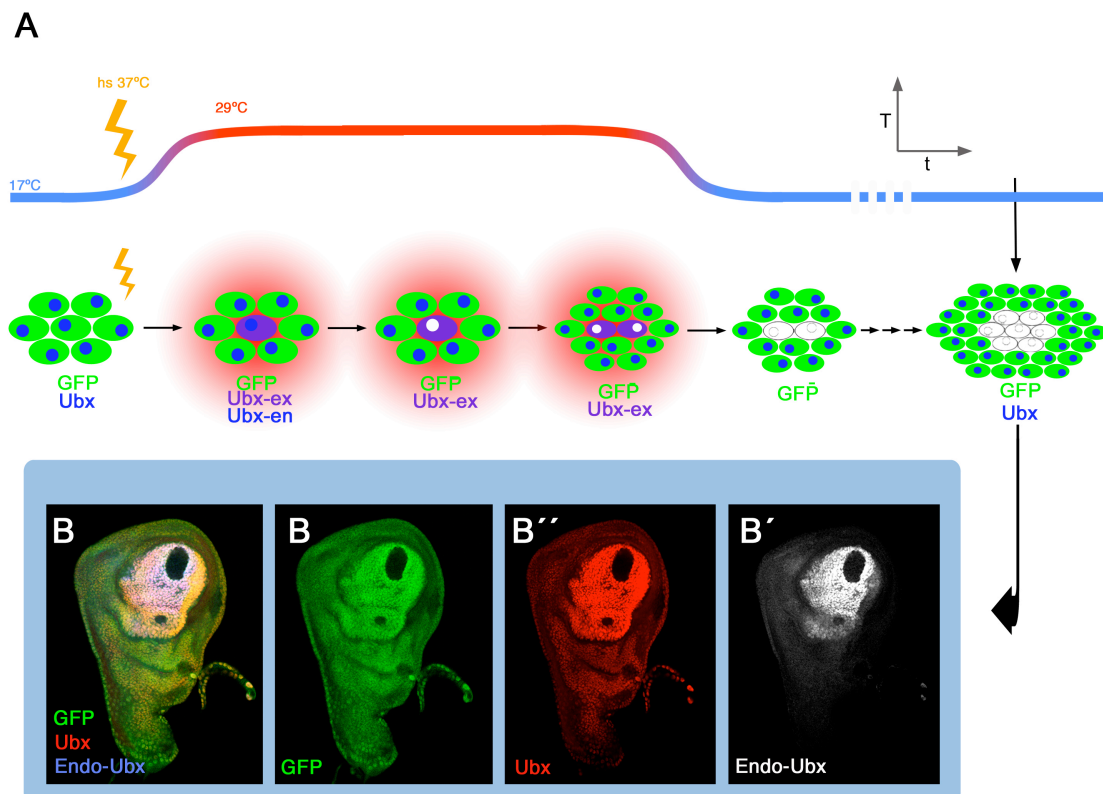


Figura R10. El bloqueo permanente de la transcripción es autónomo celular.

La sobreexpresión transitoria de *Ubx* en clones de células del disco de halterio, en moscas con genotipo *y w hs-flp; UAS-Ubx-HA/tub-Gal80^{ts}; Ubx^{lac1}/tub>GFP>Gal4*, provoca una inhibición permanente de su propia transcripción (visualizada aquí por la línea *Ubx^{lac1}*, gris en B''') en las células del clon y en sus descendientes, demostrando que se trata de un fenómeno autónomo celular y heredable tras sucesivas rondas de división nuclear.

Los resultados muestran claramente como la represión permanente de *Ubx* a nivel transcripcional ocurre exclusivamente dentro de las células del clon (Fig. R10B-B'''), permitiendo por tanto concluir que dicho efecto es estrictamente autónomo celular.

rA7. Represión permanente de una línea *Ubx-Gal4* insertada cerca de un elemento de respuesta a Polycomb (PRE)

Los genes Hox, tras ser inicialmente activados durante el desarrollo embrionario, mantienen sus estados de activación o inhibición por acción de las proteínas del grupo Trithorax y Polycomb respectivamente (ver Introducción). Puesto que nuestros resultados mostraban una represión permanente de *Ubx* nos preguntamos si las proteínas del grupo Pc podrían estar implicadas también en este proceso. Para ello, fue muy útil el estudio de la línea *Ubx-Gal4^{SS.2}*.

Como hemos mostrado anteriormente, la capacidad de las líneas Gal4 para producir transformaciones de halterio en ala o reducciones de tamaño está ocasionada por una expresión espacio-temporal variable o constante, respectivamente. Sin embargo, la línea *Ubx-Gal4^{SS.2}* es una excepción a este respecto, ya que es capaz de producir fuertes transformaciones de tejido de halterio en ala (Fig. R11B,E, comparar con el fenotipo silvestre en 11A), de pata III en pata II (Fig. R11C) y de metanotum en mesonotum (Fig. R11D) (siendo estas dos últimas altamente infrecuentes en otros genotipos), a pesar de tener dominio de expresión constante en el disco de halterio (Fig. R12A). Probamos también otras líneas *Ubx-Gal4* para dirigir la expresión de *Ubx* en el halterio, concretamente las *Ubx-Gal4^{M1}* y *Ubx-Gal4^{M3}* (de Navas et al., 2006) y en ambos casos el único efecto observado fue la reducción del tamaño del halterio (datos no mostrados), resultado esperable teniendo en cuenta que las dos líneas tienen una expresión constante. De esta manera, la línea *Ubx-Gal4^{SS.2}* parecía tener por lo tanto un comportamiento diferente a todas las líneas ensayadas. Cuando visualizamos los niveles de proteínas Ubx y GFP presentes en discos en los que ambos fueron coexpresados mediante la línea *Ubx-Gal4^{SS.2}*, ambas señales muestran un patrón idéntico que indica la pérdida de proteína en grandes regiones del disco (Fig. R12B-B'), indicando que, en este caso, la inhibición de *Ubx* está acompañada de la inhibición de la misma proteína Gal4 (comparar la expresión de GFP en Fig. R12 B' y A).

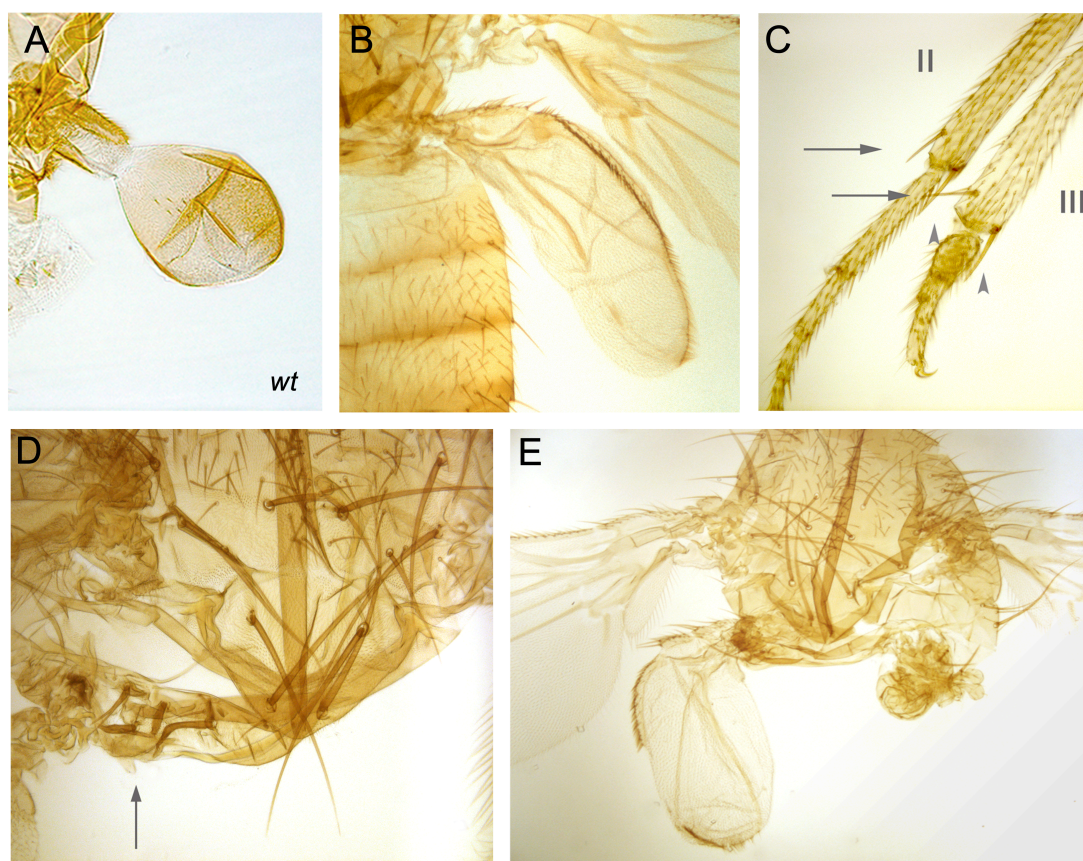


Figura R11. La sobreexpresión de *Ubx* con una línea *UbxGal4^{SS.2}* provoca transformaciones de T3 en T2.

Al elevar los niveles de proteína *Ubx* en las células de halterio en moscas *UbxGal4^{SS.2}/UAS-Ubx (SG1)* se producen transformaciones parciales de halterio en ala (B y E) (comparar con el halterio silvestre en A), y también de pata III en pata II (C), y de metanotum en mesonotum (D), siendo estas dos últimas altamente infrecuentes en otros genotipos.

Supusimos que el diferente comportamiento de las distintas líneas *Ubx-Gal4* podría deberse a las distintas posiciones cromosómicas de las respectivas inserciones dentro del locus de *Ubx*. *Ubx-Gal4^{M1}* y *Ubx-Gal4^{M3}* se encuentran localizadas “upstream” del sitio inicio de transcripción de *Ubx* (Fig. R12C; de Navas et al., 2006), mientras que nosotros, mediante la realización de una PCR inversa, conseguimos mapear la inserción *Ubx-Gal4^{SS.2}* en la posición 274.277 (coordenadas de acuerdo a Martin et al., 2005), muy cerca de la localización de PRE de la región reguladora *bx* (Fig. R12C) (Orlando et al., 1998; Ringrose et al., 2003; Papp y Müller, 2006; Beisel et al., 2007).

Nuestra hipótesis por lo tanto fue la de que la posición particular de dicha inserción, tan cerca del PRE de *bx*, podría ser la causa de su diferente efecto morfológico al sobreexpresar *Ubx*: al aumentar los niveles de *Ubx* se inhibiría la expresión dirigida por la inserción *Ubx-Gal4^{SS.2}* y la inhibición se mantendría por estar localizada cerca del PRE. Este dato sugiere, al igual que los

resultados anteriores, que las proteínas Pc podrían estar implicadas en el mantenimiento de la represión observada al sobreexpresar *Ubx*.

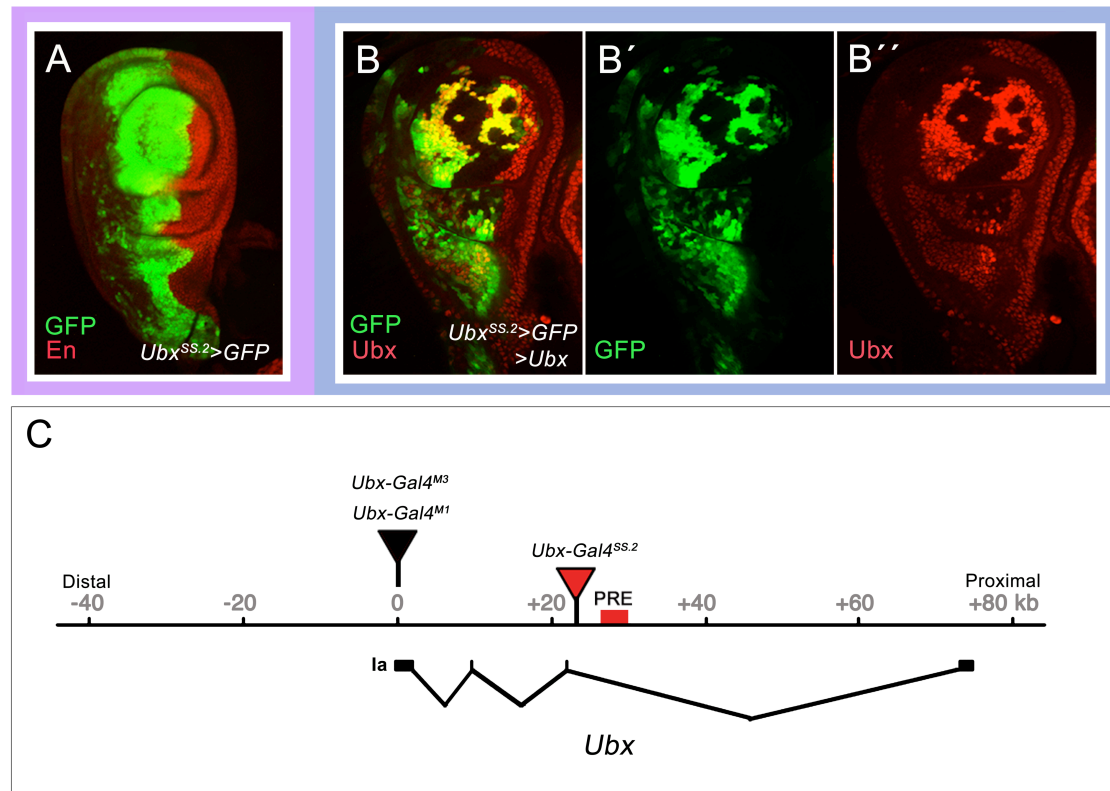


Figura R12. La línea *UbxGal4^{SS.2}* responde de manera idéntica al gen *Ubx* endógeno en condiciones de sobreexpresión.

La línea *UbxGal4^{SS.2}* se expresa en gran parte del compartimento anterior de los discos imaginales de halterio, al menos durante el estadio de larva 3 tardía, visualizada mediante la expresión de GFP en moscas *UbxGal4^{SS.2}/UASGFP* (A). Al sobreexpresar *Ubx* con esta línea (en moscas *UbxGal4^{SS.2}/UASUbx (SG1)UASGFP*) se produce una represión tanto de *Ubx* (B, B'') como de la propia línea *Gal4*, visualizada por la expresión de GFP (B, B' comparar con A). La línea *UbxGal4^{SS.2}* es una inserción de un elemento P-*Gal4* en el intrón grande de *Ubx*, comprendido dentro de la región reguladora *bithorax* de *Ubx* y próximo a un elemento de respuesta a polycomb (PRE) (C).

rA8. La represión permanente de *Ubx* depende de proteínas del grupo Polycomb y trithorax

Los últimos resultados muestran como *Ubx* es capaz de disparar un mecanismo de inhibición de su transcripción, siendo su perdurancia en el tiempo independiente de la propia proteína *Ubx*. También indican cómo la línea *Ubx-Gal4^{SS.2}*, adyacente al PRE de la región *bx*, es la única inserción capaz de ser inhibida de manera similar a la proteína *Ubx* endógena. En base a estos hallazgos, pensamos que tal vez las proteínas del grupo Pc podrían estar implicadas en el proceso de mantener inhibida la transcripción de *Ubx* una vez que ésta es bloqueada por niveles elevados de la propia proteína *Ubx*.

Para verificar esta hipótesis empleamos tres aproximaciones distintas. Primeramente estudiamos si las transformaciones de halterio en ala que se producían al sobreexpresar *Ubx* con algunas líneas Gal4, se veían modificadas en fondos mutantes para las proteínas Pc o Trx, utilizando para ello moscas de los genotipos *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx/Pc³* y *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx/trx^{E2}*. Para poder detectar si había alguna variación en el porcentaje de aparición de las transformaciones, dividimos los fenotipos observados en cuatro categorías (Fig. R13): transformaciones de halterio en ala, halterios de tamaño normal, halterios de tamaño reducido, y halterios ausentes. Las transformaciones de halterio en ala son explicadas por el fenómeno que venimos describiendo previamente, sin embargo entendemos que las reducciones de tamaño son originadas en aquellos casos en los que la línea Gal4 no llega a reprimirse y proporciona un aporte constante de proteína *Ubx* reduciendo el tamaño del tejido. Los halterios ausentes opinamos que constituyen un fenotipo más dramático originado por este mismo mecanismo. En cada cruce seleccionamos y analizamos también las moscas *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx/ TM6B*, que al no tener el fondo *Pc³* ni *trx^{E2}* constituyen un control interno (Fig. R13).

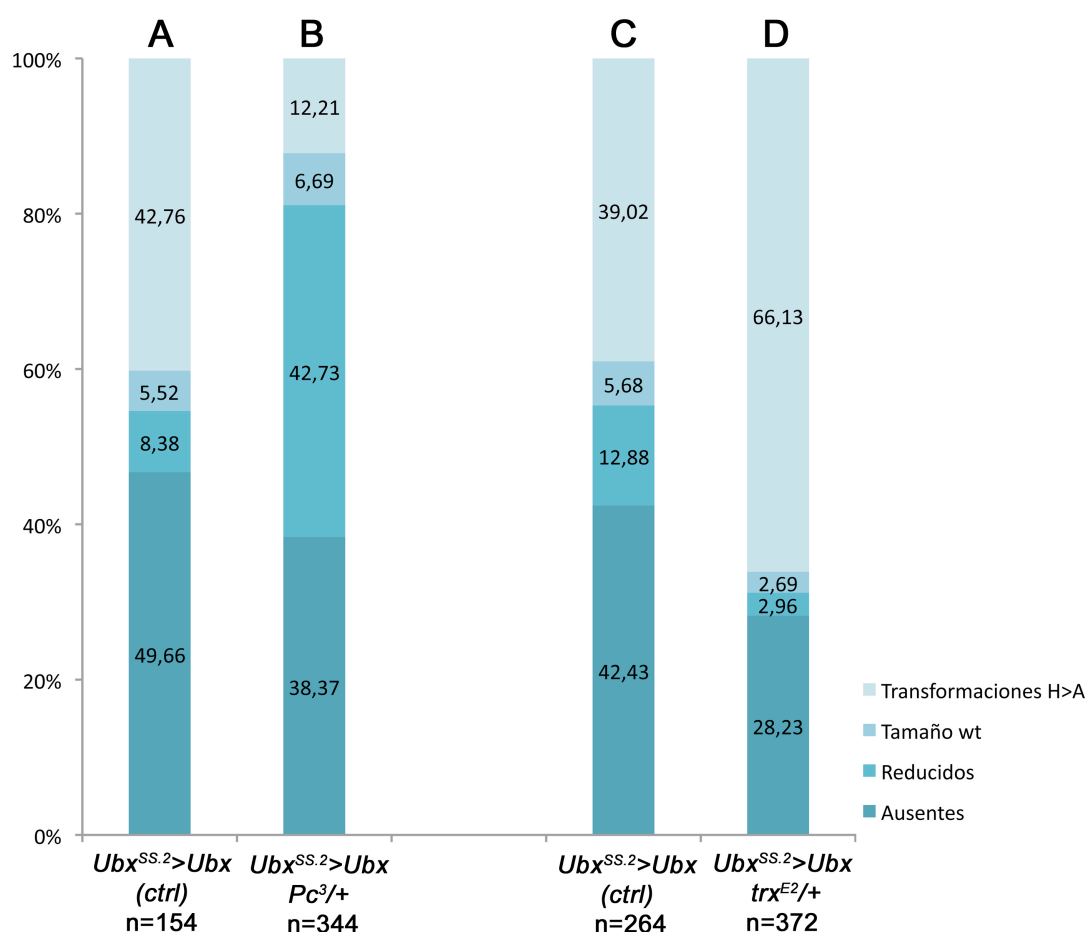


Figura R13. Mutaciones en *Pc* y *trx* afectan a la represión de la línea *UbxGal4^{SS.2}*.

Las moscas *UbxGal4^{SS.2}/UASUbx (SG1)* muestran fenotipos en sus halterios que se pueden agrupar en cuatro clases: transformaciones de tejido de halterio en ala, reducción de tamaño del halterio, ausencia de halterio y halterio de tamaño aproximadamente normal (controles A, C). Al disminuir la cantidad de *Polycomb* presente en las células de estas moscas (*UbxGal4^{SS.2}UAS-Ubx/Pc³*), la proporción de fenotipos generados en los halterios varía con respecto al control (B comparar con A). Se puede ver un aumento en la frecuencia de aparición de halterios de tamaño reducido en función de un detrimento de las transformaciones hacia ala en el halterio. Creemos que esto se debe a que la línea *UbxGal4^{SS.2}* no se reprime en el fondo *Pc³* tan fácilmente como en el control, estando permanentemente activada en un mayor número de casos, y por lo tanto proveyendo un aporte constante de *Ubx*, que reduce el tamaño de los halterios en una gran proporción de moscas. De manera inversa, moscas *UbxGal4^{SS.2}UAS-Ubx/trx^{E2}* experimentan un cambio opuesto respecto al control: apenas hay casos de halterios reducidos, mientras que se aumenta drásticamente el número de transformaciones de halterio en ala (D comparar con C). Esto se debe al efecto contrario: niveles más bajos de *trx* facilitan la represión tanto de la proteína *Ubx* endógena como de la línea *Gal4*, generándose por lo tanto zonas de tejido en las que desaparece cualquier fuente de *Ubx*.

Observamos cómo moscas *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx/ Pc³*, en las cuales el mantenimiento del estado inactivo de los genes *Hox* mediado por proteínas del grupo *Pc* se ve debilitado respecto a los individuos control, el número de transformaciones de ala en halterio se ve reducido drásticamente en beneficio del aumento del número de halterios de tamaño reducido. Este resultado se explicaría fácilmente siguiendo nuestra hipótesis: la disminución de maquinaria encargada de mantener el estado inactivo se traduciría en un mayor número de casos en los que el bloqueo permanente de la transcripción no es capaz de mantenerse en el tiempo, habiendo por tanto un continuo aporte de proteína *Ubx* exógena (dirigida por la línea *Ubx-Gal4^{SS.2}*), que resultaría, como en casos anteriores, en una disminución del tamaño del apéndice en un mayor número de casos respecto al control.

De manera inversa, moscas de genotipo *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx/ trx^{E2}*, en las cuales la situación de mantenimiento del estado inactivo de los genes *Hox* se ve facilitado indirectamente, debido a la disminución de la cantidad de una de las proteínas encargadas de mantener el estado activo, la proporción de moscas que muestran transformaciones aumenta sustancialmente, esta vez en detrimento del número de halterios reducidos y ausentes.

En un segundo grupo de experimentos seguimos la misma lógica que en el experimento anterior: intentar medir si la falta de alguna proteína de la maquinaria *Pc* alteraba los fenotipos producidos por la sobreexpresión de *Ubx*, pero en este caso, en vez de medir la frecuencia de aparición de las transformaciones, quisimos medir la expresividad de las mismas. Por este motivo, comparamos el porcentaje de la superficie del compartimento dorsal de discos de halterio de tercer estadio larvario en el que *Ubx* era permanentemente silenciado (tras haber sometido a las larvas a un protocolo estándar de sobreexpresión de *Ubx*), con el de larvas sometidas al mismo tratamiento pero en las cuales *Ubx* fue coexpresado junto con el RNAi para *Polycomb-like (Pcl)*, otra proteína del grupo *Pc* necesaria para mantener el estado inactivo de los genes *Hox* (Fig. R14). De esta manera, durante el tiempo en el que las larvas se encuentran a la temperatura permisiva,

aparte de la sobreexpresión de *Ubx* estamos inactivando en las mismas células la maquinaria Pc. Los resultados muestran contundentemente como la proporción de superficie del compartimento dorsal en la que *Ubx* sigue reprimido tras varios días a 17°C, es drásticamente menor cuando *Ubx* fue coexpresado con el RNAi de *Pcl* en larvas *ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{ts} UAS-Ubx/UAS-PclRNAi*, que en las larvas control: *ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{ts} UAS-Ubx (SG1)/+*, indicando una implicación directa de la maquinaria Pc para la manutención del estado reprimido de *Ubx*.

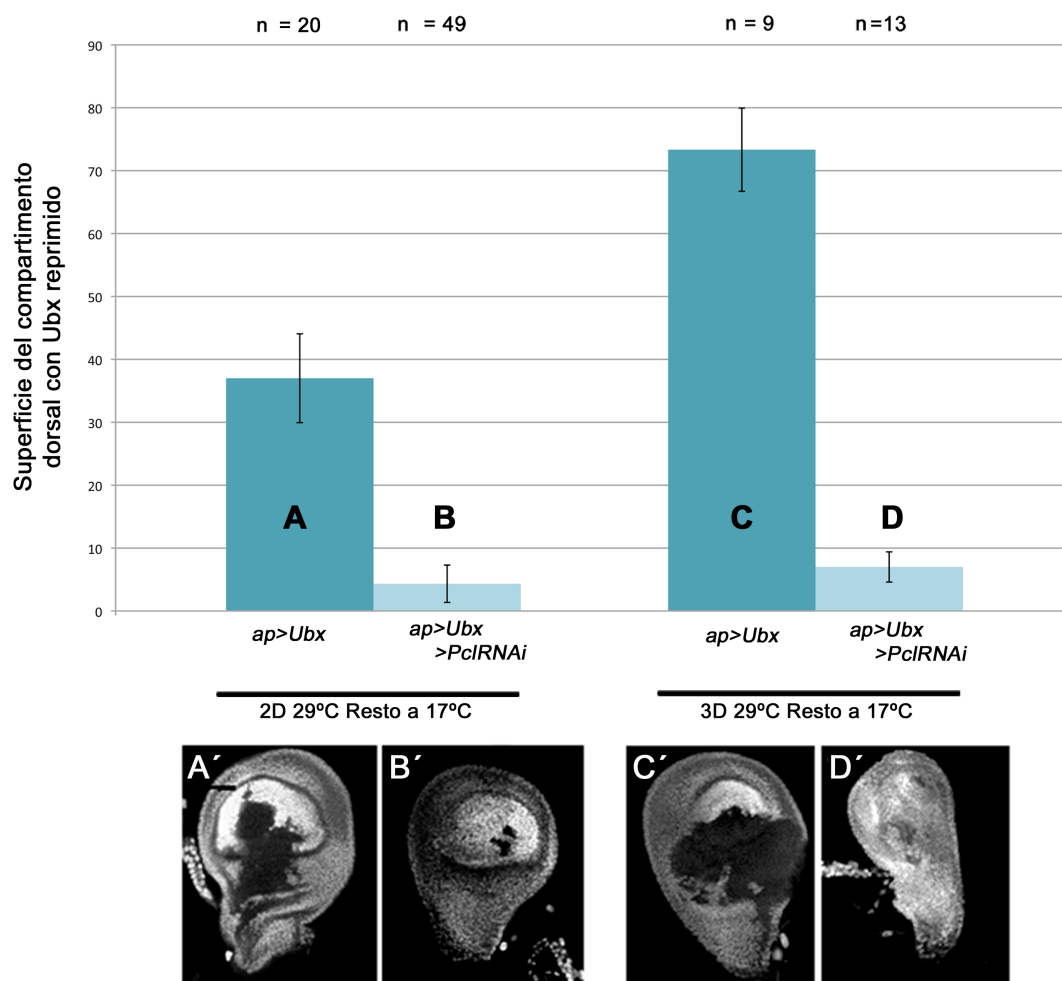


Figura R14. La eliminación de la actividad Pc impide la represión permanente de *Ubx* tras la sobreexpresión de la proteína homeótica.

La sobreexpresión transitoria de *Ubx* en moscas *ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{ts} UAS-Ubx/+* provoca la aparición de transformaciones de halterio en ala, siendo esto debido a la represión permanente del gen *Ubx* endógeno (Fig. R8). La proporción de células del compartimento dorsal del disco imaginal de halterio en las que se reprime *Ubx* varía en función de la duración de la fase de sobreexpresión: una sobreexpresión mantenida durante 48h genera un silenciamiento permanente en casi un 40% de las células de dicho compartimento (A), mientras que la prolongación de este período 24h más se traduce en la ausencia de la proteína Ubx en más del 70% de las células de dicho compartimento (C). La coexpresión del RNAi de la proteína *Pcl* junto con *Ubx* en moscas *ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{ts} UAS-Ubx/ UAS-PclRNAi*, durante esta misma fase, provoca que la proteína Ubx siga presente en casi la totalidad de las células del compartimento, tanto si la sobreexpresión se mantiene 48h (B comparar con A) como 72h (D comparar con C). Este efecto pone de manifiesto que la función de las proteínas PcG

son necesarias para mantener la represión del gen *Ubx* endógeno, tras el bloqueo de su transcripción inducido por altos niveles celulares de la proteína homeótica.

Una tercera y última aproximación al estudio de la implicación de las proteínas del grupo Pc en el fenómeno de la represión permanente de *Ubx* consistió en eliminar la función de los complejos represivos Pc en grupos de células en las que se había inhibido previamente la transcripción de *Ubx*. Para ello se aplicó el protocolo estándar de cambios de temperatura en moscas *scalloped-Gal4/hs-flp; UAS-Ubx/tub-Gal80^{ts}; Ubi-GFP FRT2A/hs-CD2 ri Pc^{XT109} FRT2A*, para inhibir la expresión de *Ubx*, y se indujeron clones de pérdida de *Pc* mediante un choque térmico (Fig. R15A). Los discos de halterio de moscas sometidas a este tratamiento, muestran claramente cómo la proteína Ubx está ausente de grandes regiones del pouch del halterio, pero presente en los clones mutantes para *Pc* (Fig. R15B-B'').

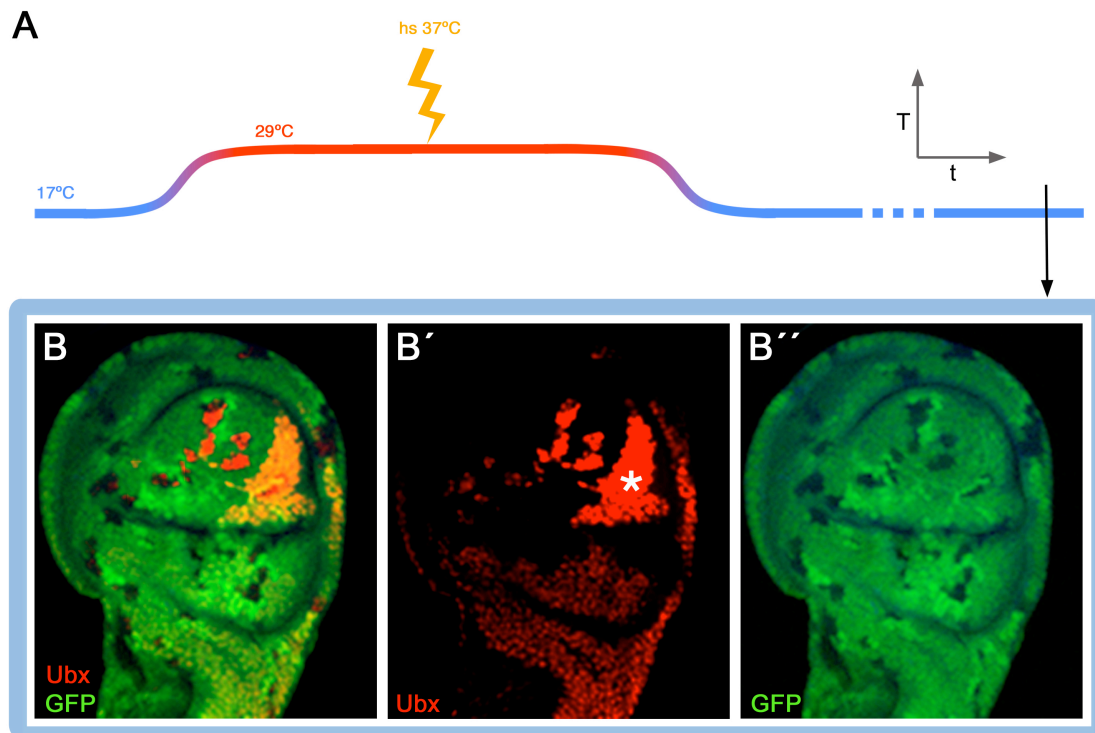


Figura R15. La eliminación de la proteína *Pc* impide la represión permanente de *Ubx*.

Moscas *sd-Gal4/hs-flp; UAS-Ubx(SG1)/+; FRT82B Pc³/FRT82B Ubi-GFP* fueron sometidas a un choque térmico para generar clones de pérdida de *Pc* durante la fase de sobreexpresión de *Ubx* dentro de un protocolo estándar de cambios de temperatura (A). Como sucede con otras líneas Gal, la sobreexpresión transitoria de *Ubx* elimina de manera permanente su propia síntesis, en este caso, del "pouch" del disco del halterio, donde se expresa la línea *sd-Gal4*. Sin embargo, dicho silenciamiento no se produce en los clones, cuyas células carecen de proteína *Pc* (B-B''), poniendo de manifiesto la necesidad de la función *Pc* para el mantenimiento del estado reprimido de *Ubx*.

Tomados en conjunto, todos estos resultados demuestran de forma fehaciente que la maquinaria de inactivación de los genes Hox llevada a cabo por las proteínas del grupo Pc, es necesaria para la perdurancia en el tiempo del mecanismo de represión dependiente de sobreexpresión de *Ubx*.

rA9. El gen Hox *abd-A* es también capaz de generar un mecanismo de represión permanente de *Ubx*.

El primer paso del mecanismo de represión permanente de *Ubx* es la inhibición de la transcripción originada por altos niveles celulares de la propia proteína *Ubx*. En base a esto pensamos que puesto que los genes Hox *abd-A* y *Abd-B* son capaces de inhibir la expresión de *Ubx* en el embrión (Struhl y White, 1985), tal vez también podrían hacerlo en los discos imaginales de halterio, disparando un mecanismo de represión permanente similar al originado por *Ubx*.

Por este motivo expresamos ectópicamente *abdA* en los discos de halterio con las líneas MS372-Gal4 y *Ubx-Gal4*^{SS.2} (Fig. R16). Los resultados obtenidos muestran cómo los halterios presentan transformaciones hacia ala (Fig.16C) muy similares a las obtenidas al sobreexpresar *Ubx* (Fig.16 B), siendo dichas transformaciones originadas por la ausencia de proteína *Ubx* de grandes regiones del disco imaginal (Fig. R16F) de manera idéntica a lo que sucede al elevar los niveles de *Ubx* (Fig. R16E). Puesto que *abdA* es capaz de reproducir el desarrollo de un halterio normal (Casares et al., 1996; de Navas et al., 2006), estos resultados indican que elevados niveles de *abd-A* también son capaces de disparar un mecanismo de represión permanente de *Ubx*.

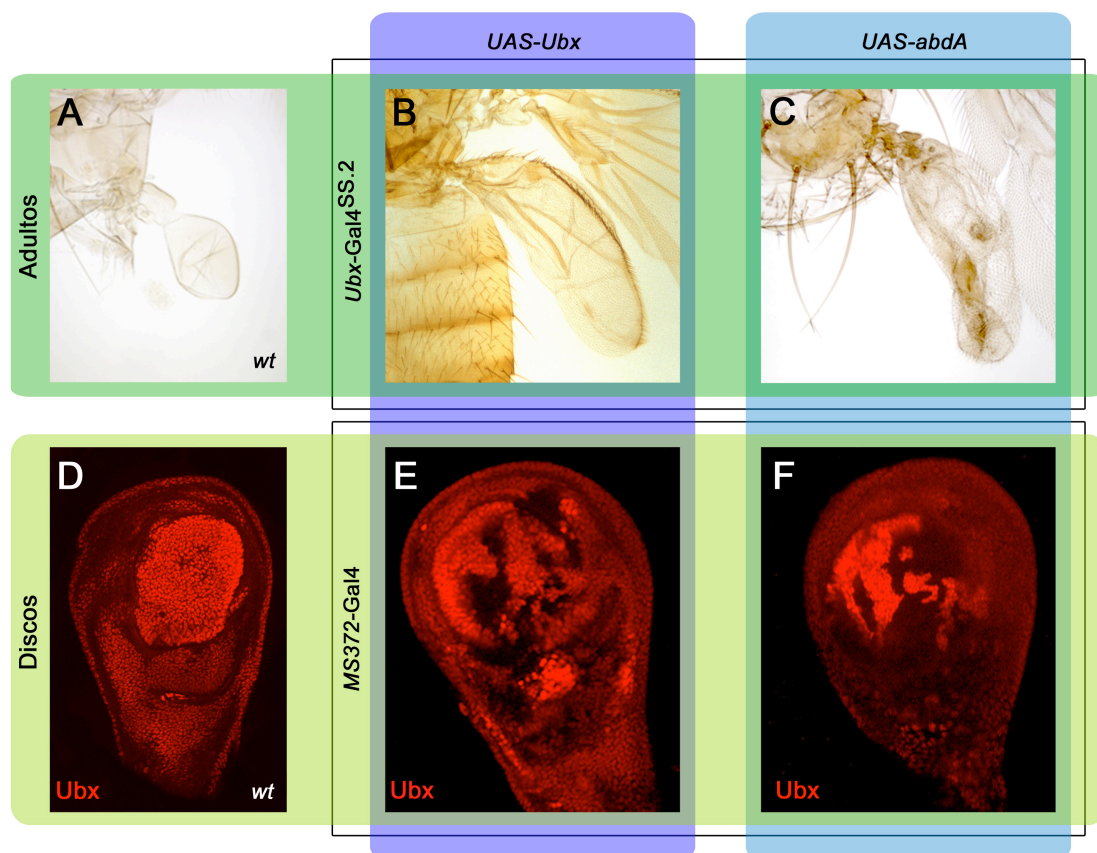


Figura R16. El gen Hox *abd-A* provoca una represión permanente de *Ubx* de manera similar al propio gen *Ubx*

(A) Halterio silvestre. La expresión ectópica de *abdA* en el disco imaginal de halterio en moscas *UAS-abdA/+; Ubx-Gal4^{SS.2}/+* genera transformaciones parciales de dicho apéndice en ala (C) similares a las obtenidas en moscas *Ubx-Gal4^{SS.2}/UAS-Ubx(SG1)* (B). (D) Expresión de *Ubx* en un disco de halterio silvestre. Las transformaciones del halterio en ala al expresar *abd-A* se producen por la represión permanente del gen *Ubx* endógeno en los discos de halterio (F) de moscas *UAS-abdA/+; MS372-Gal4/+*, de la misma manera que en discos *MS372-Gal4/UAS-Ubx(SG1)* (E).

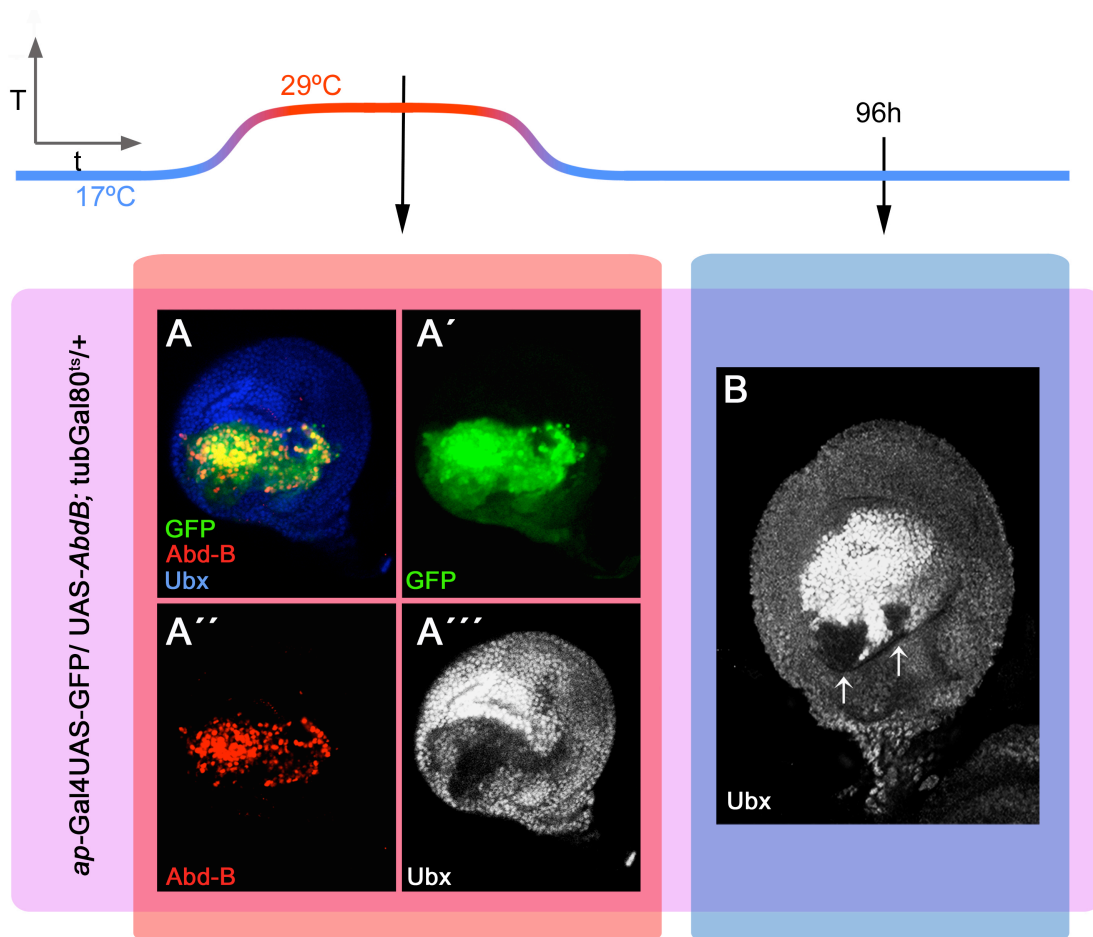


Figura R17. El gen *Abd-B* es capaz de inhibir la transcripción de *Ubx* pero no de disparar un silenciamiento permanente

(A-A''') Discos imaginales de halterio de moscas *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-AbdB; tub-Gal80^{ts}/+* sometidos a una expresión permanente de *AbdB* muestran una bajada en los niveles de proteína *Ubx* (en gris en A'''). Si la expresión de *AbdB* es transitoria, muy rara vez se ve represión permanentes de *Ubx* (como las mostradas en B).

Sin embargo, los resultados obtenidos para *Abd-B* fueron diferentes; moscas de genotipo *UAS-Abd-B/+; MS372-Gal4/+* apenas mostraban transformaciones de halterio en ala, y cuando ocasionalmente lo hacían eran muy sutiles (no mostrado). Para estudiar ésto en detalle usamos la línea *ap-Gal4* para sobreexpresar *Abd-B* siguiendo el protocolo estándar de cambios de temperatura (Fig. R17). Los discos de halterio de larvas en las que constantemente se expresa *Abd-B* muestran una bajada considerable de los niveles de proteína *Ubx* (Fig. R17A-A'''). Sin embargo, casi nunca se mantiene dicha represión. Sólo rara vez, en pequeños grupos de células perdura la

inhibición de Ubx (Fig. R17B) y en consecuencia las moscas adultas muestran transformaciones parciales de halterio en ala.

En vista de estos resultados podemos concluir que tanto *abd-A* como *Abd-B* son capaces de reprimir la expresión de *Ubx*, pero solo *abd-A* es capaz de disparar un mecanismo estable de represión permanente de *Ubx*.

rA10. El dominio UbdA de la proteína Ubx podría ser necesario para su represión permanente.

Las proteínas Ubx y abdA presentan una serie de dominios comunes tales como el Hexapéptido (HX) y el dominio UbdA de los cuales carece AbdB (Chan y Mann, 1993; Burglin, 1994; Mann y Chan, 1996). En función de los diferentes resultados obtenidos para las tres proteínas homeóticas, pensamos que tal vez alguno de estos dominios fueran necesarios para la represión permanente de *Ubx*. Para comprobar esta idea, sobreexpresamos versiones quiméricas de Ubx carentes de uno de estos dos motivos: Ubx^{HX} (carente del dominio Hexapéptido) y Ubx^{UbdA} (carente del dominio UbdA) (Merabet et al., 2007) y analizamos si se producía o no represión permanente de *Ubx* (Fig. R18).

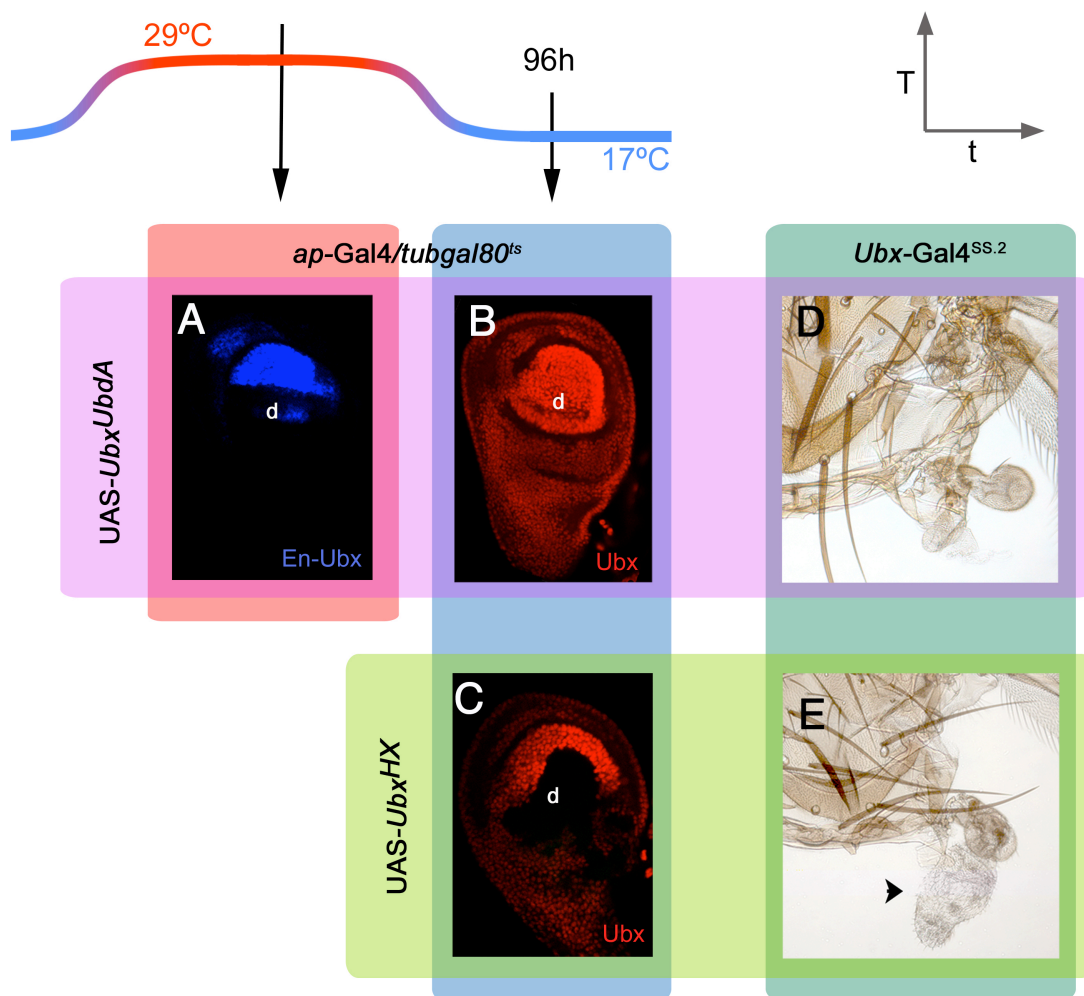


Figura R18. Sobreexpresión de versiones quiméricas de la proteína Ubx en el disco imaginal de halterio

La sobreexpresión constante de Ubx^{UbdA} en moscas $ap-Gal4 \text{ UAS-GFP/UAS-}Ubx^{UbdA}; tub-Gal80^{ts}/+$ logra reprimir la traducción de la proteína Ubx endógena (A) en la mayor parte de las células del compartimento dorsal (d). Sin embargo, esta represión no se hace permanente más allá del cese de las condiciones de sobreexpresión (B). De manera contraria, la sobreexpresión transitoria de Ubx^{HX} en moscas $ap-Gal4 \text{ UAS-GFP/ UAS- } Ubx^{HX}; tub-Gal80^{ts}/+$, desencadena un bloqueo permanente de la transcripción de Ubx , visualizado por la ausencia de proteína en el compartimento dorsal de los discos (C). De manera consistente con este hecho, sólo la sobreexpresión de Ubx^{HX} con la línea $UbxGal4^{SS.2}$ es capaz de inducir transformaciones de halterio en ala en el adulto (D, E).

Sólo se obtuvieron transformaciones de halterio en ala, y ocasionalmente de metanotum en mesonotum, al sobreexpresar Ubx^{HX} , no así con Ubx^{UbdA} empleando en ambos casos la línea $Ubx-Gal4^{SS.2}$ (Fig. R18E y D, respectivamente). Consistentemente con este hecho, sólo se observó ausencia de proteína Ubx, tras varios días a 17°C de larvas sometidas a un protocolo estándar, en los discos de halterio en los que se expresó la línea $UAS-Ubx^{HX}$ y no en los que se expresó $UAS-Ubx^{UbdA}$ (en moscas con genotipo $ap-Gal4 \text{ UAS-GFP/ UAS-}Ubx^{HX}; tub-Gal80^{ts}/+$ y $ap-Gal4 \text{ UAS-GFP/ UAS-}Ubx^{UbdA}; tub-Gal80^{ts}/+$, respectivamente) (Fig. R18 C,B). Sin embargo, Ubx^{UbdA} es capaz de inhibir o al menos disminuir la síntesis del Ubx endógeno si es expresada de manera constante (Fig. R18A).

En función de estos resultados podemos concluir que mientras que el dominio HX no es necesario para ningún aspecto de la represión permanente de Ubx , parece que el dominio $UbdA$ podría no ser necesario para la represión de la transcripción de Ubx endógeno, pero sí para el silenciamiento permanente. No obstante, puesto que no podemos afirmar con seguridad que la inhibición de Ubx sea completa cuando Ubx^{UbdA} se expresa de manera permanente en el compartimento dorsal (Fig. R18A), podría ser que la ausencia de un bloqueo total de la transcripción imposibilitara una respuesta de represión permanente del gen homeótico.

rA11. El gen *engrailed* también se reprime permanente por altos niveles de su proteína.

Resultados similares a los obtenidos con Ubx fueron observados con el gen *engrailed*, el cual es necesario para determinar la identidad posterior en los segmentos de *Drosophila* (Morata y Lawrence, 1975; Kornberg et al., 1985). Este gen también está regulado por su propio producto en los discos imaginales (Guillén et al. 1995; Simmonds et al., 1995; Tabata et al., 1995). Al emplear la línea *en-Gal4* para aumentar los niveles de proteína Engrailed en los compartimentos posteriores aparecen fenotipos de transformación de compartimentos posteriores en anteriores, como los observados en el notum (Fig. R19A) y en el ala (Fig. R19B,B'), que recuerdan a las transformaciones obtenidas en moscas con mutaciones hipomorficas para *en* (García-Bellido y Santamaría, 1972; Morata y Lawrence, 1975; Lawrence y Morata, 1976; Guillén et al. 1995; Simmonds et al., 1995; Tabata et al., 1995).

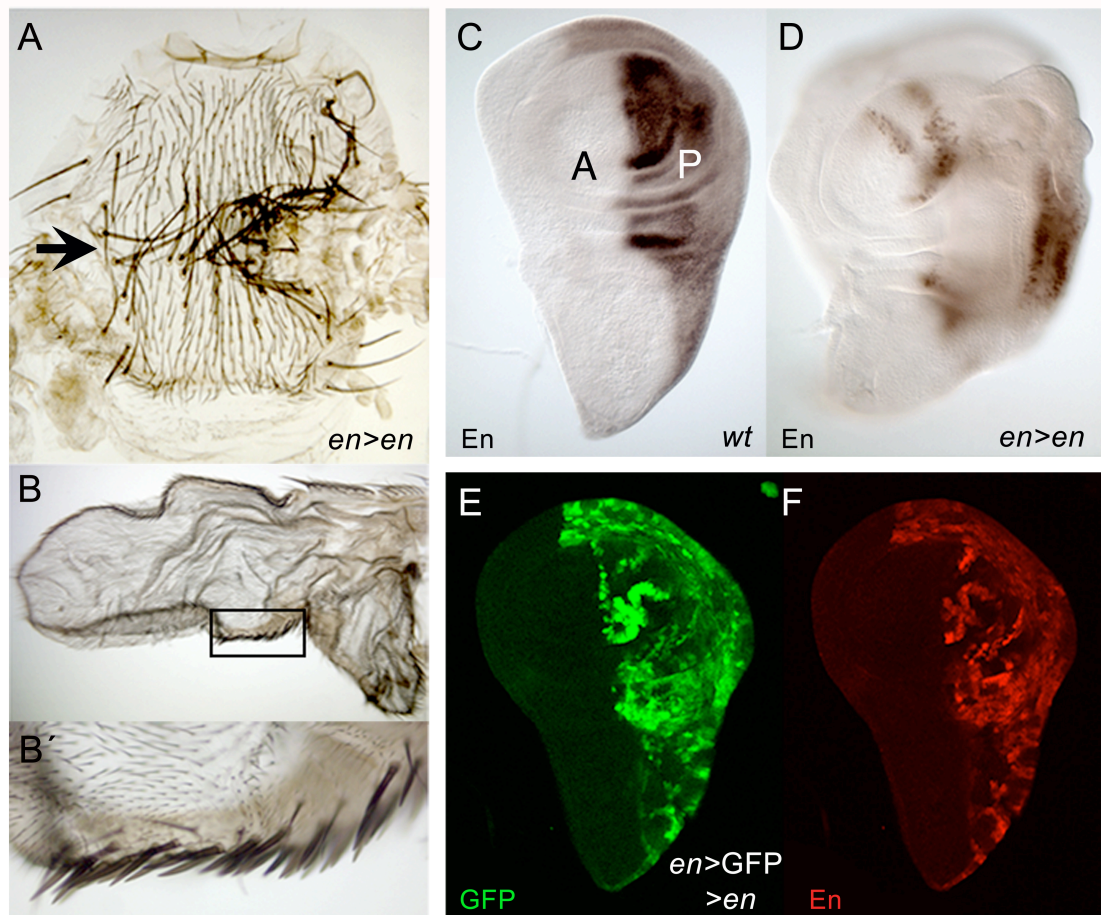


Figura R19. Niveles elevados de la proteína En provocan la inhibición del gen endógeno.

La sobreexpresión de la proteína En en los compartimentos posteriores de los discos de ala, en moscas *en-Gal4 UASGFP/UAS-en*, produce transformaciones de posterior (p) en anterior (a) en dichos compartimentos, tanto en el notum de la mosca (A), que muestra una duplicación especular del compartimento anterior (flecha, A), como en el ala (B), donde aparecen estructuras típicamente anteriores en el margen posterior del ala (cuadro, B). Estas transformaciones están originadas por la pérdida de la proteína En en grandes regiones del disco en moscas *en-Gal4 UASGFP/UAS-en* (D, F comparar con la expresión silvestre en C). La línea *en-Gal4*, generada por la inserción de un elemento Gal4 en las secuencias reguladoras del gen *engrailed* (Tabata et al., 1995), se reprime de manera idéntica al gen endógeno (GFP en E).

Los discos imaginales de moscas con este genotipo muestran la eliminación de la proteína En en grandes porciones de tejido (Fig. R19D y 19F comparar con el silvestre en 19C) (Guillen et al. 1995; Tabata et al., 1995), así como la eliminación de la proteína GFP (Fig. R19E) dirigida por la misma línea *en-Gal4*, lo cual indica que no solo la proteína En está siendo reprimida de manera permanente sino que la línea Gal4 también, de una manera similar a lo que ocurre con el *Ubx-Gal4^{SS.2}*, siendo este fenómeno disparado por unos altos niveles de la propia proteína En. Para comprobar esta idea, repetimos los experimentos de cambios de temperatura estándar, expresando transitoriamente la línea *UAS-en* bajo el control de *ap-Gal4*, y monitorizamos el estado

transcripcional del gen endógeno mediante el uso de una inserción *en-lacZ* (Hama et al., 1990) (Fig. R20). Tras 3 días a 17°C no observamos recuperación de la transcripción de *engrailed* (Fig. R20A,A''') ni tampoco de proteína total (Fig. R20A, A'') en el cuadrante dorsal posterior del disco imaginal de ala.

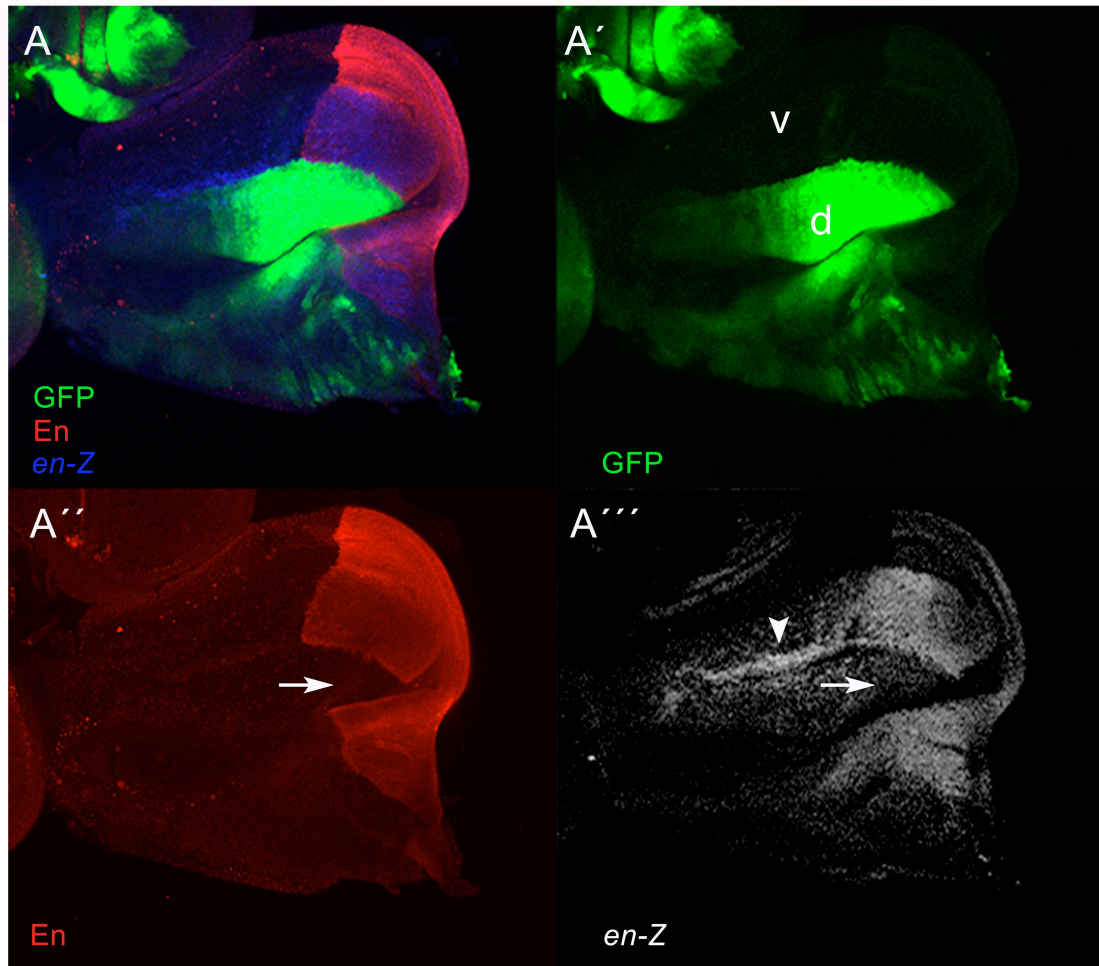


Figura R20. La sobreexpresión transitoria de En produce la inhibición permanente de la transcripción del gen endógeno.

(A-A''') Discos imaginales de ala sometidos a una expresión transitoria de la proteína En en el compartimento dorsal y diseccionados tres días después del cambio a 17°C. El compartimento dorsal está parcialmente marcado por la elevada perdurancia de la proteína GFP (en verde en A, A'). En las células posteriores pertenecientes a dicho compartimento se observa la ausencia tanto de proteína En (A'') como de transcripción, monitorizada por la inserción *en-lacZ* (A'''). También se puede apreciar cierta expresión ectópica de β -galactosidasa en el borde dorsoventral del compartimento anterior (flecha en A'''). (d y v señalan los compartimentos dorsal y ventral, respectivamente).

Estos resultados apuntan a que *engrailed* también es capaz de responder a niveles elevados de su propia proteína de una forma análoga a *Ubx*, generando una respuesta permanente de inhibición de la transcripción.

rA12. *abd-A* y *Abd-B* no muestran represión permanente en respuesta a niveles elevados de sus productos.

En vista de que dos genes homeóticos poseían este mecanismo de represión permanente dependiente de altos niveles de la misma proteína, nos preguntamos si tal vez éste podría ser común a otros genes Hox del BX-C como *abd-A* o *Abd-B*. Para abordar esta cuestión estudiamos la respuesta transcripcional de ambos genes a su propia sobreexpresión en los discos genitales de hembra en moscas de genotipo UAS-*abd-A*/+; *dpp*-Gal4 UAS-GFP/*abd-A*-lacZ y UAS-*Abd-B*/+; *dpp*-Gal4 UAS-GFP/*Abd-B*-lacZ. Al contrario de lo descubierto para *Ubx* y *en*, no se observó represión de la transcripción de las construcciones “indicadoras” en ninguno de los dos casos (Fig. R21), tan sólo una bajada sutil en los niveles de *Abd-B*-lacZ (Fig. R21B, B'), y concluimos por tanto, que ni *abd-A* ni *Abd-B* son capaces de bloquear su propia transcripción, y consecuentemente tampoco de mantener una hipotética represión en el tiempo de manera estable.

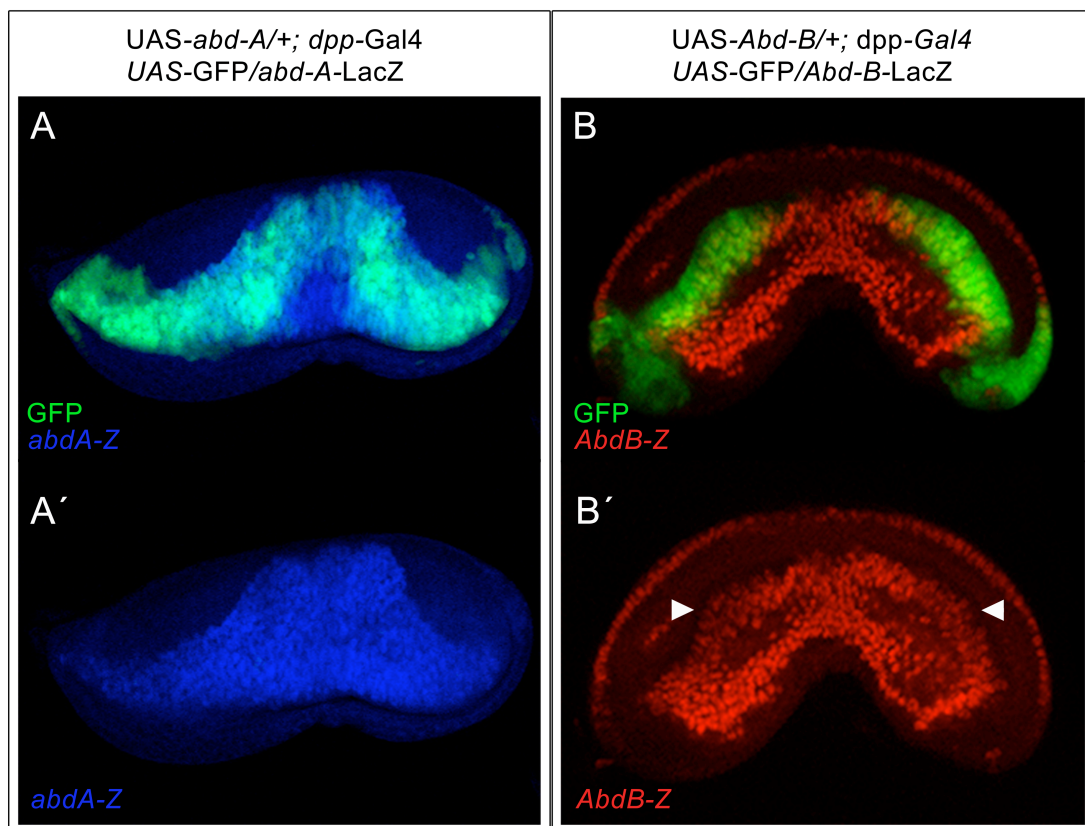


Figura R21. *abdA* y *AbdB* no son capaces de reprimir su propia síntesis.

(A-B') Discos genitales hembra de tercer estadio larvario de larvas UAS-*abd-A*/+; *dpp*-Gal4 UAS-GFP/+ y UAS-*Abd-B*/+*dpp*-Gal4 UAS-GFP/+ (A y B, respectivamente). Niveles elevados de la proteína homeótica AbdA no provocan una disminución de la transcripción del gen *abdA* endógeno, monitorizado mediante la inserción *abd-A*-lacZ (azul A, A'). De manera similar, tampoco se observa inhibición de la transcripción de *Abd-B* al aumentar los niveles celulares de su propia proteína (rojo en B y B'), tan sólo una leve reducción de la intensidad de la señal (cabezas de flecha en B).

rA13. Mecanismo de autorepresión de *Ubx* durante el desarrollo del individuo silvestre

Tras haber descubierto y descrito este mecanismo en el que genes como *Ubx* y *en* son capaces de eliminar de manera permanente su propia expresión, nos preguntamos si este mecanismo estaría ocurriendo en algún tejido durante el desarrollo normal de *Drosophila* para asegurar el correcto patrón de expresión de estos genes.

En el embrión, *Ubx* se expresa en el compartimento posterior del segundo segmento torácico (T2p), dirigiendo el correcto desarrollo de este compartimento y evitando una transformación de T2p en T1p en la cutícula larvaria y también en los primordios imaginales embrionarios, precursores de los discos imaginales larvarios (Lewis 1963, Morata y Kerridge 1981; Kerridge y Morata, 1982; Lewis, 1982; Miñana y García-Bellido, 1982; Hayes et al., 1984; Casanova et al., 1985). Sin embargo, en estadios más avanzados del desarrollo, la expresión de *Ubx* en el compartimento T2p sólo se detecta levemente en el disco de pata y en la membrana peripodial del disco de ala (White y Wilcox, 1984, Beachy et al., 1985), pero no en el T2p del disco en sí.

Estudios clonales detallados indican que *Ubx* no es necesario para la especificación del T2p más allá de la mitad del desarrollo embrionario, pero que su función en los primeros estadios del embrión se necesita para dirigir la formación correcta del segmento T2p en la parte proximal del disco de ala y en el disco de pata II (Morata y Kerridge 1981; Kerridge y Morata, 1982; Casanova et al., 1985). Estos resultados indicarían que el patrón de expresión de *Ubx* sufre un cambio durante el desarrollo, puesto que es expresado en algún momento del desarrollo embrionario temprano en las células posteriores del primordio imaginal de ala, pero no en etapas posteriores del desarrollo.

Este cambio en el patrón de expresión de *Ubx* cambio podría estar promovido por la propia proteína *Ubx*: la línea 35UZ, consistente en la fusión de la proteína β -galactosidasa con el fragmento de 35kb inmediatamente "upstream" del promotor de *Ubx* (Fig. R22C), tiene un patrón de expresión similar al gen homeótico en T2p durante todo el desarrollo, es decir, se expresa en el T2p en el embrión pero no así en los discos imaginales (Fig. R22A)(Irvine et al. 1991). Sin embargo, en fondos mutantes que reducen la cantidad de *Ubx* presente en las células del T2p tales como *abx*¹, *abx*², *bx*³ y *bx*^{83kb}, se detecta señal de dicha línea en los compartimentos posteriores de algunos discos de ala (Fig. R22B) (Irvine et al., 1991). Este resultado parece indicar que ciertas secuencias reguladoras de *Ubx*, contenidas en el fragmento de 35 kb de la línea 35UZ, son capaces de modificar su control sobre la expresión de *Ubx* en respuesta a la misma proteína *Ubx*, silenciándolo en las células del T2p del disco imaginal de ala durante el resto del desarrollo de los individuos silvestres.

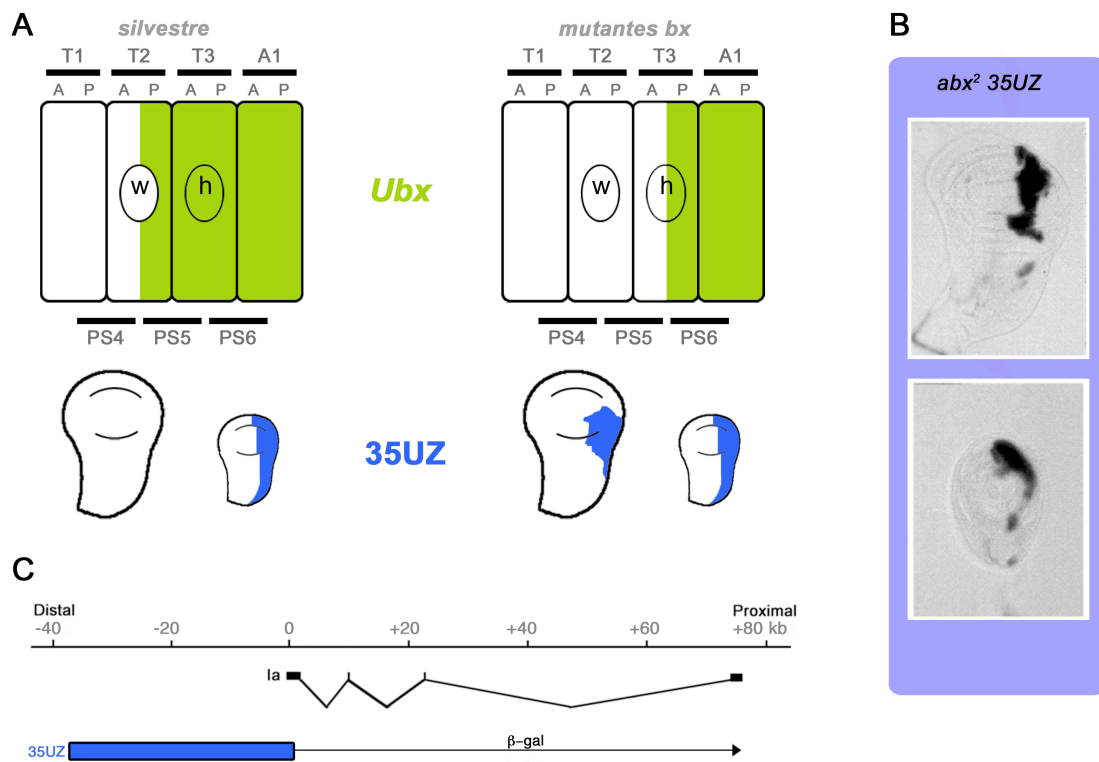


Figura R22. La línea 35UZ se desreprime en T2p en mutantes *Ubx*.

(A) Representación esquemática del patrón de expresión de *Ubx* (verde) y de la línea 35UZ (azul) tanto en el individuo silvestre como en los mutantes *abx*¹, *abx*², *bx*³ y *bx*^{83kb}. (B) Imágenes de la expresión de dicha línea en discos imaginales *abx*² (Irvine et al., 1993). (C) Representación esquemática de la línea 35UZ.

Nosotros quisimos comprobar en primer lugar si *Ubx* era por tanto expresado en las células del T2p durante algún momento del desarrollo. De manera indirecta, nosotros comprobamos que al menos una línea Gal4 insertada en *Ubx*, el *Ubx-Gal4*^{M1}, era también expresada en el T2p durante el desarrollo temprano de *Drosophila*. Para ello usamos la técnica de "trazado de linaje", que permite descubrir las células que expresaron en algún momento del desarrollo la proteína *Ubx* (en nuestro caso la línea *Ubx-Gal4*, que se expresa como el propio gen). Las moscas de genotipo *f^{36a}; abx>f⁺>lacZ/UAS-flp; Ubx-Gal4^{M1}/+* llevan una mutación para *forked*, un marcador cuticular que produce quetas más pequeñas y torcidas que las normales y tricomas también de apariencia retorcida; sin embargo, en estas moscas las quetas y tricomas son normales porque tienen además una copia extra del gen *forked*, que rescata dicho fenotipo, flanqueada por secuencias FRT de levadura que recombinan en presencia de una fuente de flipasa. Sólo en aquellas células en donde se exprese la línea Gal4, que dirige la expresión de la flipasa (UAS-flp) las secuencias FRT que flanquean el gen *f⁺* recombinarán entre sí escindiendo el fragmento de DNA que contiene dicho gen, y por lo tanto mostrarán quetas con fenotipo *forked*. Las moscas con el genotipo mencionado anteriormente muestran quetas *forked* en el compartimento posterior del

ala y de la pata 2 (Fig. R23A-C), indicando que la construcción *Ubx-Gal4^{M1}* se ha expresado en las células que formarán este tejido en algún momento del desarrollo. Por el contrario, si restringimos la expresión de la inserción *Ubx-Gal4^{M1}* al desarrollo larvario exclusivamente, se obtiene otro resultado: en moscas de idéntico genotipo pero con una copia de la inserción *tub-Gal80^{ts}*, y en las que mantenemos los embriones a temperatura permisiva (29°C), pasando las larvas a temperatura restrictiva (17°C) después, observamos como ya no aparecen quetas *forked* en ninguno de los dos tejidos (Fig. R23 D, E). Este resultado indica que al menos esta línea *Ubx-Gal4* y por lo tanto posiblemente el gen *Ubx*, se expresan tempranamente en el compartimento posterior del disco de ala, tal y como apuntaban los estudios anteriores.

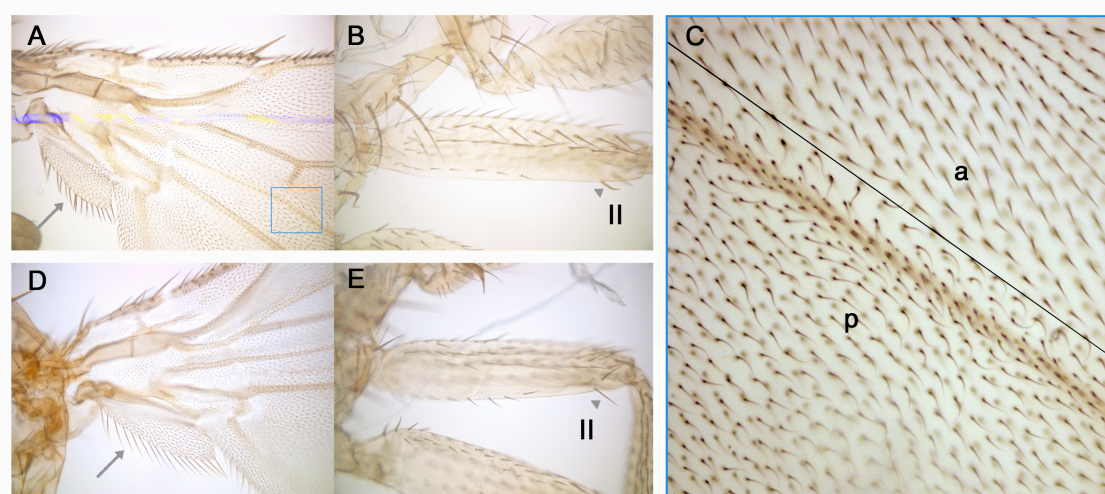


Figura R23. La línea *Ubx-Gal4^{M1}* se expresa en las células del T2p durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*.

Cutículas adultas de moscas *f^{36a}*; *abx>f⁺>lacZ/UAS-flp*; *Ubx-Gal4^{M1}/+* (A-C) y *f^{36a}*; *abx>f⁺>lacZ/UAS-flp*; *Ubx-Gal4^{M1}/tub-Gal80^{ts}* (D, E). Individuos con expresión permanente de la línea *Ubx-Gal4^{M1}* desarrollan en el T2p de alas (A, C) y patas (B) quetas *forked* (flecha en A, cabeza de flecha en B), indicando que la proteína Gal4 ha sido expresado en ellas en algún momento del desarrollo. Al eliminar la expresión del *Ubx-Gal4^{M1}* durante desarrollo embrionario exclusivamente (D,E), las moscas no presentan quetas *forked* en los compartimentos T2p (flecha en alas D, cabeza de flecha en patas E), lo cual demuestra que la expresión de la línea *Ubx-Gal4^{M1}* se produce durante ese periodo.

Quisimos por lo tanto visualizar directamente la expresión de *Ubx* en el T2p y el momento en el que dicha expresión cesaba en el primordio imaginal de ala. Para ello realizamos tinciones inmunohistoquímicas en embriones de genotipos *Dll-lacZ³⁰⁴/UAS-GFP*; *hh-Gal4/+* y *esg-lacZ/UAS-GFP*; *hh-Gal4/+*, en los cuales los compartimentos posteriores están marcados por la expresión de GFP dirigida por la línea *hh-Gal4* y los primordios imaginales por las líneas P-lacZ insertados en los genes *Distalless (Dll)* y *escargot (esg)*, respectivamente. La visualización de estos embriones muestra nítidamente la expresión de *Ubx* en las células de los compartimentos

posteriores de los precursores imaginales de ala hasta aproximadamente el estadio 12 (Fig. R24A), momento a partir del cual comienza a disminuir hasta que en el estadio 15 es prácticamente indetectable (Fig. R24B).

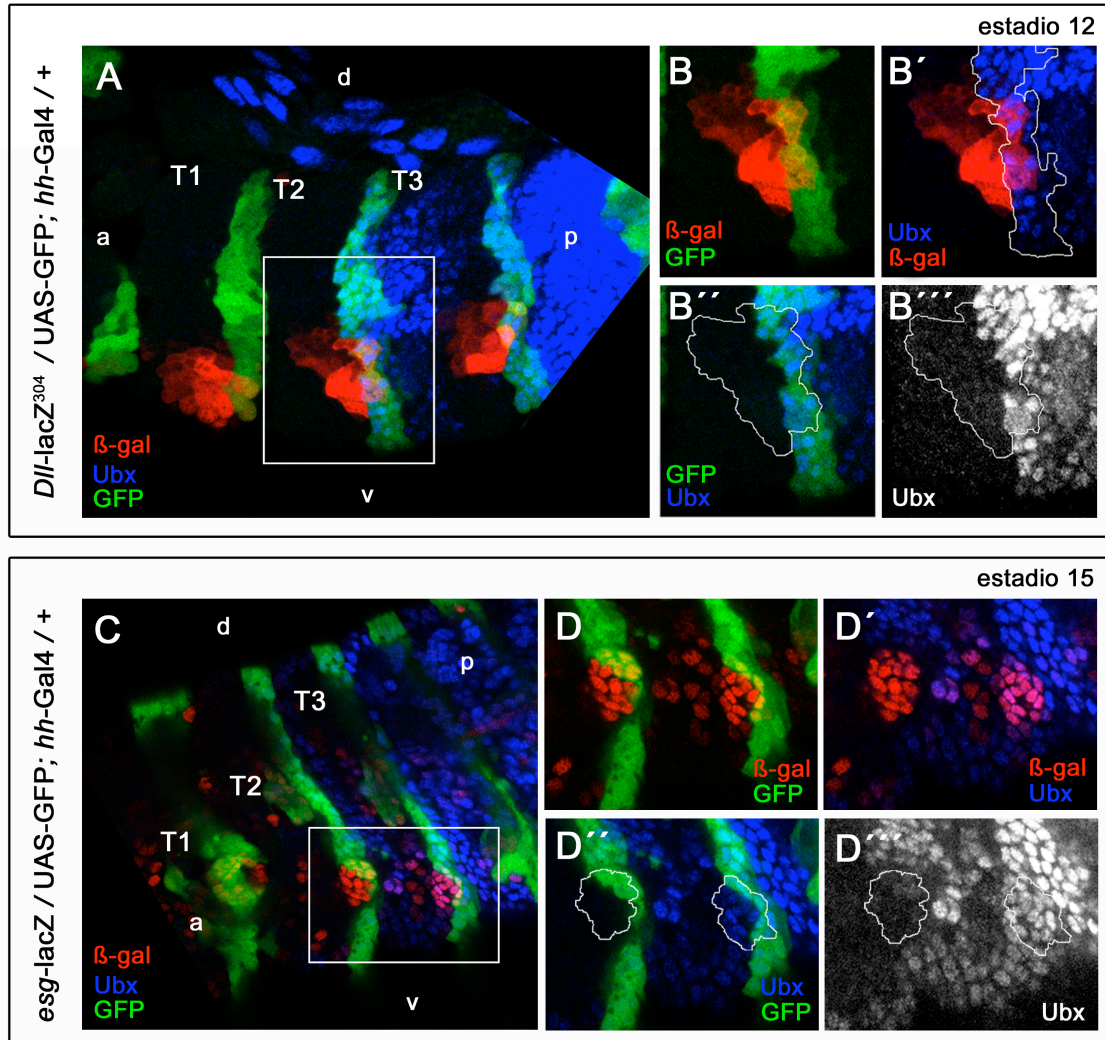


Figura R24. *Ubx* se expresa en las células posteriores de los primordios embrionarios de los discos del T2.

Tinciones inmunohistoquímicas de embriones de estadios 12 (A-B''') Y 15 (C-D''') en los cuales los primordios embrionarios de los discos imaginales aparecen marcados en rojo, identificados por la expresión de las inserciones *Dll-lacZ³⁰⁴* y *esg-lacZ*, respectivamente. Los compartimentos posteriores son identificables mediante la expresión de la línea *hh-Gal4 UASGFP* (en verde). La proteína *Ubx* es nítidamente detectable en los compartimentos posteriores de los primordios del T2 (azul en A, B', B'' y gris en B''') hasta el estadio 12. En estadios posteriores, su expresión disminuye hasta ser indetectable a partir del estadio 15 (azul en C, D', D'' y gris en D''').

Estos resultados confirman que *Ubx* se expresa en el compartimento posterior de los discos de ala durante el desarrollo embrionario temprano, lo cual podría originar un mecanismo de represión permanente de *Ubx* en las células de dicho compartimento, motivo por lo cual *Ubx* nunca se detecta en dichas células durante el resto del desarrollo.

B

ESTUDIO DEL CONTROL DEL TAMAÑO DEL NOTUM POR EL GEN *Ultrabithorax* DURANTE LA METAMORFOSIS DE *Drosophila melanogaster*.

El tórax de *Drosophila melanogaster* se compone de la fusión de 12 discos imaginales, 6 de ellos dorsales y otros 6 ventrales, correspondientes a tres segmentos distintos: T1, T2 y T3. Sin embargo, la contribución de cada segmento es muy diferente: el notum está constituido prácticamente en su totalidad por el T2 dorsal, derivado del disco de ala, el cual adquiere un tamaño muchísimo mayor que el T3 (Fig. R25B, C). Sin embargo, la diferencia de tamaño entre las regiones presuntivas de notum de los discos imaginales de ala y halterio, a partir de las que se forma el notum adulto, en el tercer estadio larvario es mucho menor (Fig. R25A). Esto indica que se existe un crecimiento neto del T2 frente al T3 que acrecienta la diferencia de tamaño entre ambos segmentos durante la metamorfosis (ver Introducción).

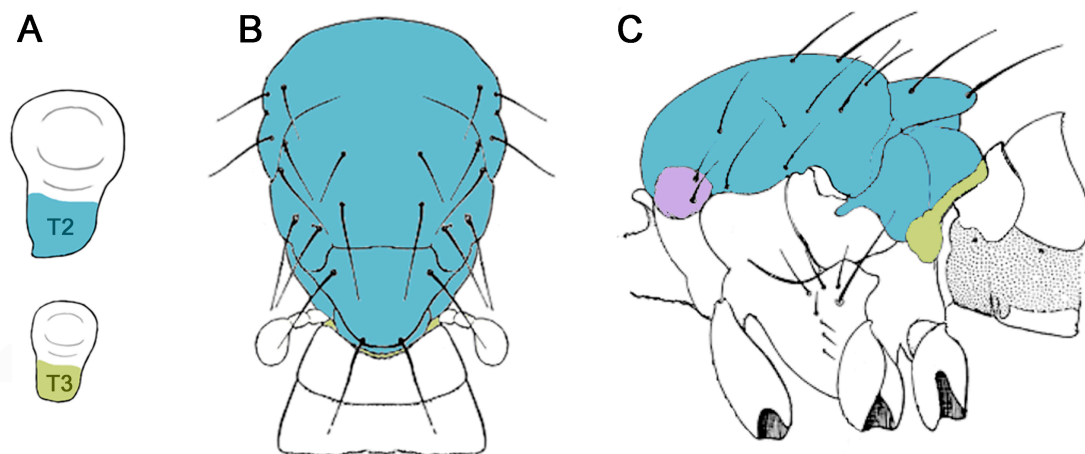


Figura R25. Esquema de los derivados de los discos imaginales torácicos en el adulto.

Las partes proximales de los discos imaginales de ala (T2, en azul y T3, en verde, respectivamente), a la izquierda, se corresponden con zonas en el adulto de muy distinto tamaño, el mesonotum (en azul) y el metanotum (en verde), a la derecha. El húmero, marcado en morado, proviene del disco imaginal humeral.

rB1. El fragma mesotorácico.

Mientras que la identificación de los apéndices no plantea problema ninguno, la correcta identificación de segmentos al nivel del tronco es más complicada ya que no existe una separación física clara entre ellos. Tradicionalmente se ha considerado metanotum a una pequeña banda de tejido que une los halterios situados a ambos lados del cuerpo de *Drosophila* (Figs. R25B y 26B, flechas). Sin embargo dicha porción de cutícula es difícilmente apreciable en la región más medial, donde el segmento abdominal 1 (A1) parece ser la continuación del T2 (Figs. R25B y 26B, cabeza de flecha). Para intentar determinar exactamente que partes de la cutícula adulta correspondían al T3 utilizamos la mutación *Tufted*, la cual se caracteriza por la aparición de quetas extras en el notum (Ritterhof, 1952; Lai, 2003) . Aparte de las quetas extra observadas en el T2, encontramos que moscas con esta mutación presentaban quetas también en dos segmentos triangulares de tejido adyacentes a los halterios (Fig. R26B-D), que deberían corresponder por tanto al T3. Aún así, en la porción mas medial de tejido no aparecían quetas, por lo cual no estábamos seguros de si el segmento T3 era continuo “de lado a lado”. No obstante, al diseccionar y montar estas moscas para su correcta visualización bajo el microscopio, nos encontramos con que había una porción de tejido a continuación del identificado como T3, de aspecto cuticular pero que se encontraba dentro del cuerpo de la mosca, y que sólo se detectaba al eliminar los tejidos internos y el abdomen (Fig. R26C). Aún mas, en ciertos casos, cuando intentamos separar el abdomen del tórax, ocasionalmente esta cutícula interna se desplegaba como si estuviera compuesta por una doble capa plegada sobre si misma (Fig. R26D). En estos casos se puede comprobar como esta estructura forma un continuo de cutícula entre el T2 y las zonas con quetas adyacentes a los halterios, que

suponemos son pertenecientes al T3. Encontramos una referencia en la que se describía esta estructura cuticular interna y que recibe el nombre de fragma mesotorácico, que separa el torax del abdomen, y se extiende de lado a lado de *Drosophila* desde una posición posterior a las alas (Ferris, 1950). No se sabe con certeza si el fragma corresponde al mesotórax o al metatórax.

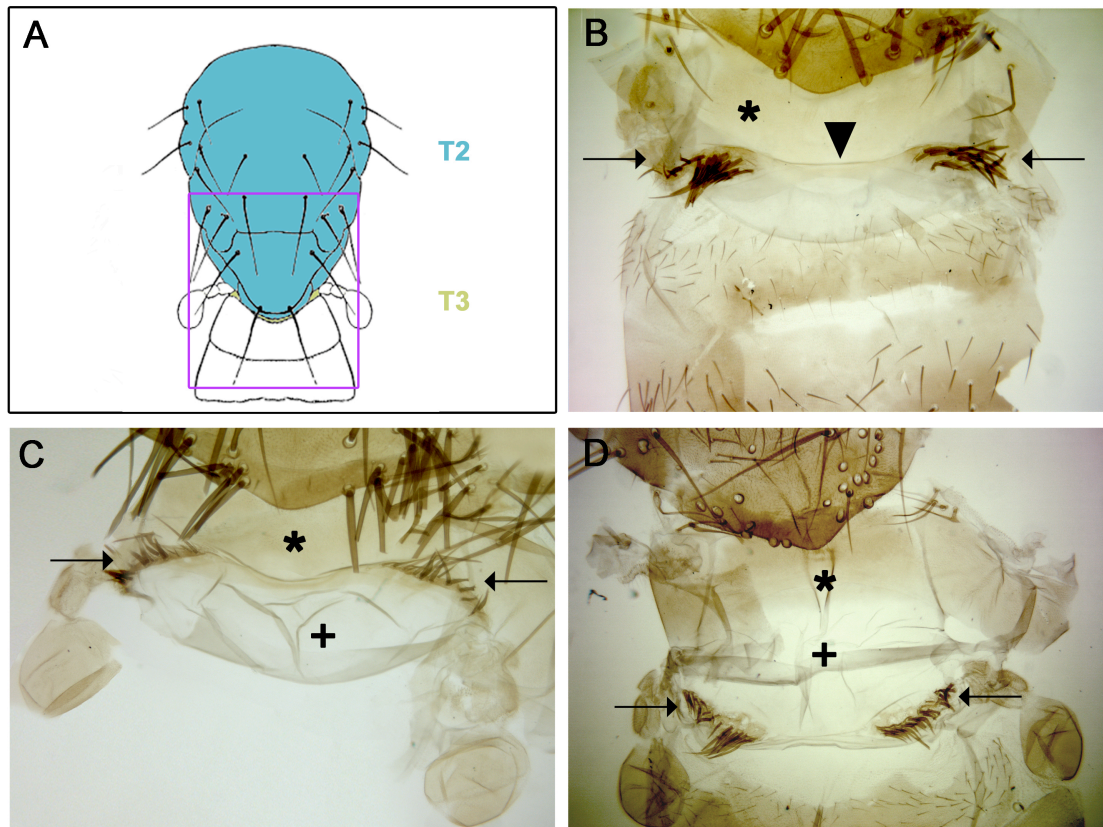


Figura R26. El fragma mesotorácico.

(A) Representación esquemática de la vista dorsal de un tórax de *Drosophila*. T2 (azul) y T3 (verde) señalan los segmentos torácicos segundo y tercero, respectivamente. (B-D) Distintas visualizaciones del fragma mesotorácico en moscas mutantes para Tft, que hace desarrollar cerdas en el T3 y produce también mas cerdas en el T2. La porción de tejido que une los halterios a lo ancho del tronco de *Drosophila* es claramente visible en las zonas laterales (flechas en todas las imágenes) mientras que es casi ausente en la zona medial (cabeza de flecha en B), donde el abdomen parece casi continuación del T2 (asterisco marcando el postnotum en T2 en todas las imágenes). La eliminación del abdomen deja al descubierto una porción de cutícula existente entre tórax y abdomen (cruz en C y D), que se prolonga hacia el interior de la cavidad torácica de *Drosophila* y que recibe el nombre de fragma mesotorácico (C). Una disección cuidadosa del fragma mesotorácico revela que está compuesto por dos capas plegadas sobre sí mismas continuas con el tórax y el abdomen (D).

Nos preguntamos por tanto a qué segmento o segmentos pertenecería este nuevo tejido, y si formaría parte del metanotum o del mesonotum. Para intentar averiguar esta cuestión realizamos una serie de reconstrucciones en el eje Z para visualizar la expresión de *Ubx* en individuos faratos con genotipo His2A-YFP/+; *Ubx-Gal4^{M1}/UAS-dsred* (Fig. R27D, D'). La inserción *Ubx-Gal4^{M1}* reproduce el patron de expresión de *Ubx* en embriones y discos imaginales (de Navas

et al., 2006). Las imágenes muestran cómo en la hipotética posición en la que se encuentra el fragma (Fig 27A-C), aparece una elevada densidad de células que expresan *Ubx*, que se hunden hacia el interior del torax (Fig. R27C), y que presuntamente podrían estar formando esta estructura.

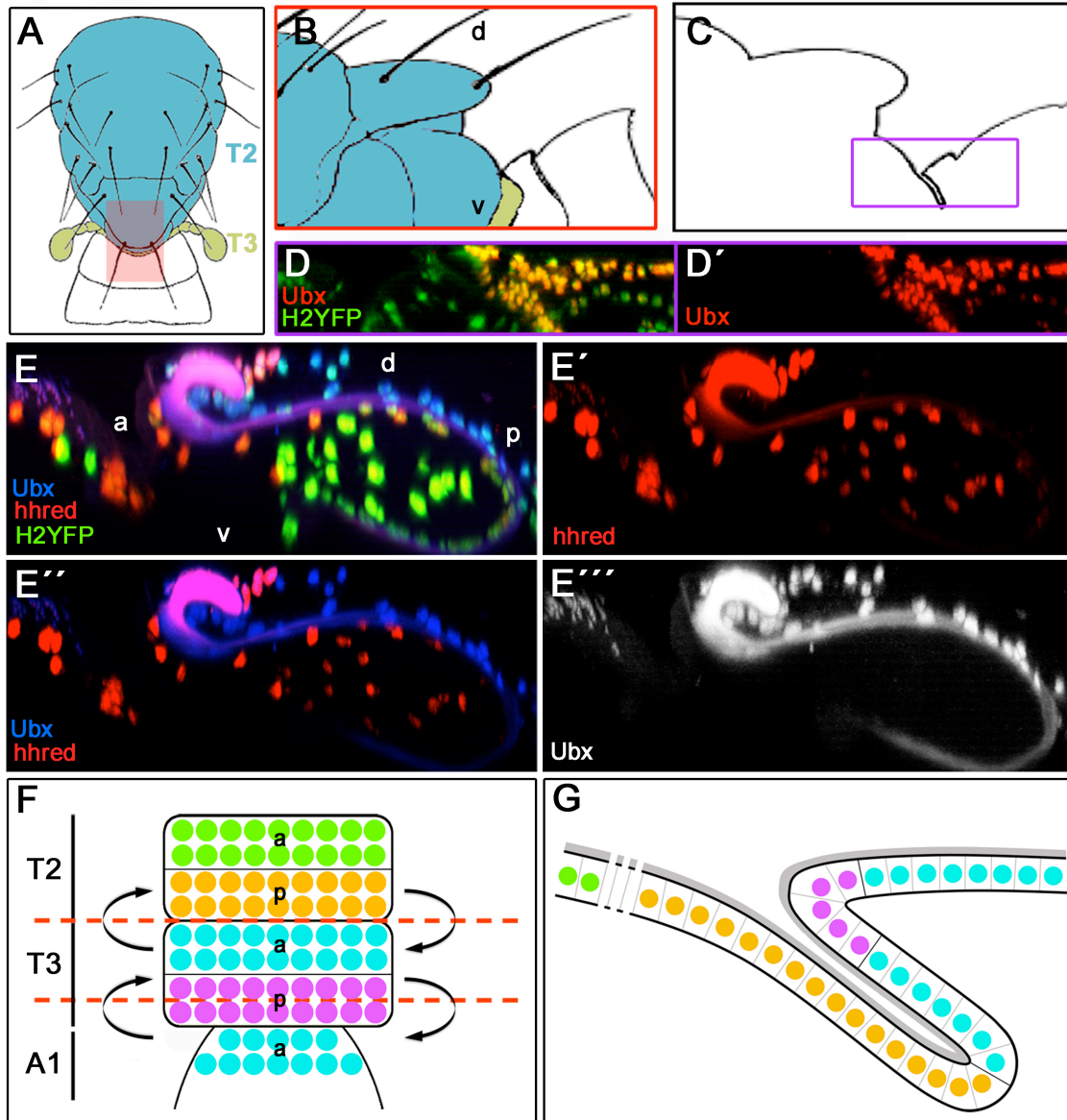


Figura R27. Identificación genética del fragma mesotorácico.

(A, B) Representación esquemática de la vista dorsal y lateral, respectivamente, de un tórax de *Drosophila* (T2 en azul, T3 en verde). (C) Representación esquemática del plano sagital medio del tórax de *Drosophila* (fragma mesotorácico en el cuadro magenta). (D y E) Proyecciones sagitales máximas de dos "stacks" de imágenes que abarcan la región sombreada en rojo en A (en el plano frontal, algo más estrecha en E) y la recuadrada en magenta en C (en el plano sagital). (D, D') Imagen tomada "in vivo" de una mosca *His2A-YFP/+; Ubx-Gal4^{M1}/UAS-Dsred*. En ella se pueden apreciar como existe un acúmulo de núcleos que expresan *Ubx-Gal4^{M1}* (rojo) que adoptan una forma elongada hacia el interior del tórax y que podrían corresponder a los núcleos que integran el fragma mesotorácico (todos los núcleos aparecen marcados en verde). (E-E''') Imagen de tejido fijado y teñido mediante técnicas inmunohistoquímicas de una mosca *His2A-YFP/+; hh-Dsred/+*. Todos los núcleos aparecen marcados en verde, los pertenecientes a los compartimentos posteriores en rojo, y los que expresan *Ubx* en azul, de

manera que según la combinación de unos marcadores u otros, las células de cada compartimento quedan marcadas de una manera única: T2a en verde, T2p en naranja (suma de *hh*-Dsred y His2A-YFP), T3a en cian (suma de His2A-YFP y Ubx), T3p en magenta (Suma de His2A-YFP, Ubx y *hh*-Dsred) y A1a en cian (suma de His2A-YFP y Ubx) (representado en F). Este marcaje permite visualizar el origen de las dos capas de que forman el fragma, cuyos cuerpos celulares se hayan a ambos lados de una zona con fluorescencia inespecífica que podría corresponder a la cutícula segregada por las mismas (E-E''). De anterior a posterior, a continuación de las células del postnotum (T2p) se observa cómo la capa de células más anterior del fragma (en posición parcialmente ventral debido al montaje) se compone también de células pertenecientes al T2p (naranja). Después de una amplia curva, el tejido se pliega completamente sobre sí mismo y deja en una posición más dorsal la capa que se encuentra más posterior en la secuencia de segmentos, cuyas células pertenecen al T3a (cian). A continuación la estructura adquiere una forma rizada en una posición totalmente dorsal, en la cual las células presentan una coloración magenta, indicativo de T3p. Por último en la posición más posterior (dentro del orden segmental) se encuentran las células del A1a (también en cian) (E-E'', esquemático en G). Para la formación del fragma mesotorácico (representado en G), han de producirse por tanto dos pliegues (líneas de puntos en F). a es anterior, p es posterior, d es dorsal y v es ventral.

Decidimos por tanto diseccionar los faratos e intentar marcar todos los segmentos inequívocamente. Para ello, generamos moscas de genotipo His-2AYFP/+; *hh*-red/+, en las cuales todos los compartimentos posteriores aparecen marcados en rojo y todos los núcleos celulares en verde. Además, incubamos las muestras con anticuerpo contra Ubx para poder identificar las células correspondientes al T3-A1a. El resultado se muestra en la Figura R27 E-E'', donde se puede apreciar cómo el fragma mesotorácico está compuesto por dos capas de células separadas por una zona que muestra fluorescencia inespecífica y que podría ser cutícula secretada por ambas capas celulares (Fig. R28E). La estructura del fragma, por tanto, adquiere una forma peculiar a causa del plegamiento del tejido para formar las dos capas. Centrándonos en esta estructura, se puede apreciar cómo la capa que se encuentra más ventral y anterior es continua con el postnotum (T2) y expresa *hh* pero no *Ubx*, lo cual indicaría que estas células siguen perteneciendo al T2p y serían una prolongación del mismo más allá de la región identificada tradicionalmente como postnotum. Por el contrario, las células de la capa en una posición más dorsal y posterior pierden la expresión de *hh* y ganan la de *Ubx*, indicando que se trata por tanto del compartimento anterior del T3 (T3a). Siguiendo la morfología de estas capas nos encontramos con un rizo que queda dorsal a toda la estructura, y cuyas células mantienen la expresión de *Ubx* pero también expresan *hh*, demostrando que este es el compartimento posterior del T3 (T3p). Creemos que esta es la banda de tejido que puede observarse externamente con la lupa binocular y que había sido identificada previamente como metanotum. A continuación de estas células podemos observar otras en las cuales *Ubx* se mantiene pero no así *hh*, que podrían ya pertenecer por lo tanto al compartimento anterior del primer segmento abdominal (A1a) (Fig. R27E-E'' y G).

En base a este resultado creemos que la región más posterior del tórax dorsal de *Drosophila* forma dos pliegues, uno en T2 y otro en T3, que facilitan la formación del fragma mesotorácico, una porción de exoesqueleto que queda inmersa dentro del cuerpo de *Drosophila* y que está formada por dos capas celulares plegadas sobre sí mismas, de las cuales una pertenece al segmento T2 y otra al T3 (Fig. R27F, G).

rB2. Cuantificación del tamaño celular en el notum

Para resolver la cuestión de cómo ocurre el incremento de tamaño diferencial entre el meso y el metanotum durante el desarrollo pupal, empezamos por estudiar la evolución del tamaño celular en ambos tejidos, estimada en base a su superficie en su sección máxima. Para ello empezamos por calcular la superficie celular en los tejidos de notum de ambos discos en el estadio de larva 3, inmediatamente antes de la pupación. Para este propósito empleamos larvas que expresan GFP bajo el promotor del gen *shotgun*, que codifica para la E-cadherina, proteína implicada en las uniones adherentes y que, por tanto, constituye un buen marcador de membrana plasmática. Así pudimos determinar los contornos celulares y medir la superficie máxima de las mismas (ver materiales y métodos). Los resultados finales del tamaño celular entre T2 y T3 están expuestos en la figura 28, y muestran cómo ya en este momento existe una diferencia en el tamaño celular entre ambos discos. Como media, la superficie máxima de las células del tejido presuntivo de mesonotum es 1,25 veces la de las células del metanotum (Fig. R28C).

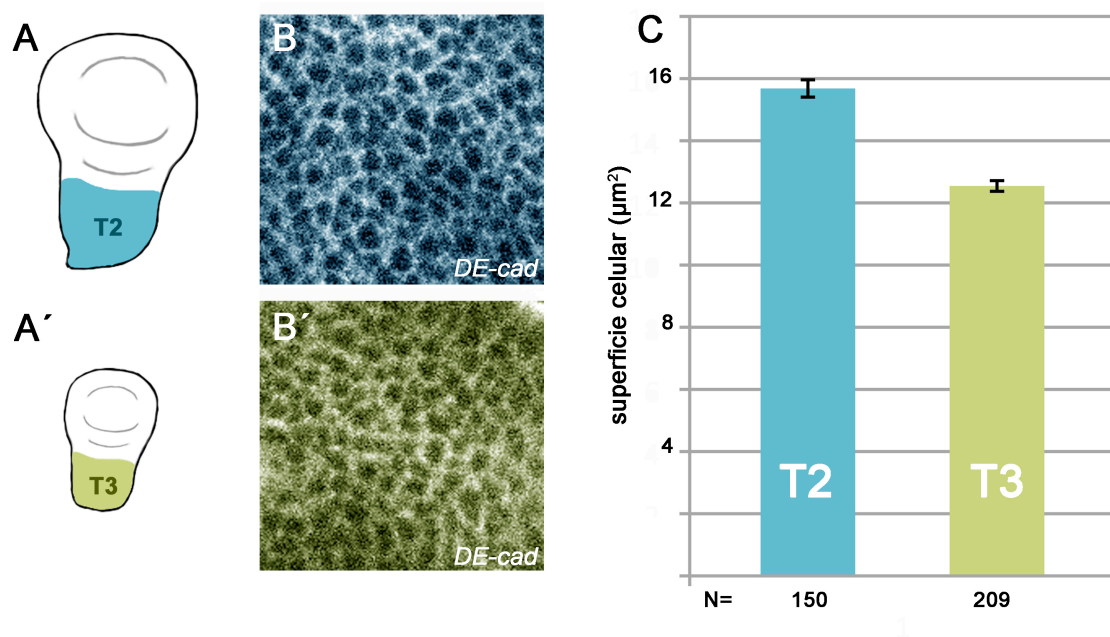


Figura R28. Cálculo de la superficie celular en los discos imaginales de ala y halterio.

(A, A') Representación esquemática de las regiones presuntivas de mesonotum (azul) y metanotum (verde) de los discos de ala (T2) y halterio (T3) donde se realizaron las medidas de superficie celular. (B-B') Marcaje de los perímetros celulares en las regiones de ambos discos de individuos *DE-cad-GFP*. (C) Representación del valor medio de la superficie celular (máxima en sección transversal) en las regiones indicadas (T2 en azul, T3 en verde). Se puede apreciar como existe una diferencia entre los valores obtenidos para ambos discos ya en el tercer estadio larvario, cuando fueron realizados los cálculos.

Para determinar el tamaño de las células en el notum adulto, decidimos previamente hacer un estudio del tamaño celular en diferentes regiones del mismo con el fin de analizar si existía variación entre diferentes regiones del mismo segmento, debido a la gran dimensión del

tejido y de las diferentes formas que adopta. Esta vez utilizamos el marcador de membrana *neuroglian* (*nrg*-GFP) (Morin et al., 2001), de expresión más fuerte durante la pupación que el anteriormente usado *Ubi-DE-cadh*-GFP (Oda y Tsukita, 2001). En ninguna de las regiones estudiadas (Fig. R29A) las células presentaban diferencias significativas de tamaño con respecto a las de ninguna otra zona, con la excepción de las células cercanas a las zonas del hinge, las cuales eran significativamente mas pequeñas, y las células del fragma pertenecientes al T2, las cuales sorprendentemente eran un 50% más grandes que las del resto del T2 (Fig. R29B), siendo ésta una diferencia muy significativa estadísticamente.

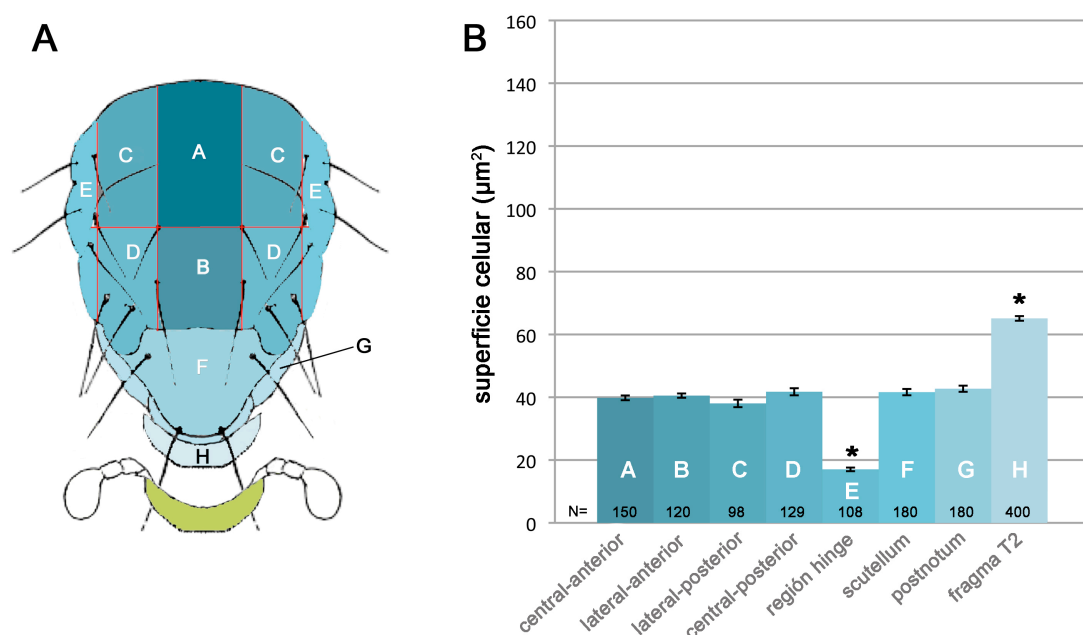


Figura R29. Estimación de la superficie celular en el mesonotum adulto.

(A) Representación esquemática de la vista dorsal de un tórax de *Drosophila* en el que se muestran los sectores en las cuales se midió la superficie celular (mesonotum en azul, metanotum en verde). (B) Representación de los tamaños celulares medios (estimados en base a superficie celular) de los sectores estudiados. Tan sólo las células de las regiones cercanas al "hinge" y las de la capa perteneciente al T2 del fragma, mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) y muy significativas ($p < 0.01$), respectivamente, frente al resto de sectores.

El cálculo del tamaño de las células del fragma, tanto en el T2 como en el T3 precisó de un tratamiento particular (ver Materiales y Métodos). Las imágenes obtenidas muestran a simple vista que el tamaño celular en el fragma entre el T2 y el T3 es muy diferente (Fig. R30A, B), pero, paradójicamente, es mayor en el T3 que en el T2 (Fig. R30D). Esto implica que el metanotum, aún teniendo un tamaño mucho menor que el mesonotum, posee unas células de tamaño mucho mayor, aproximadamente el doble que sus vecinas del fragma T2, y más del triple que las del resto del notum (a excepción de las aquellas de regiones cercanas al hinge).

La evolución del tamaño celular durante la pupación muestra cómo el incremento de tamaño sufrido por las células del metanotum es mucho mayor al sufrido por las células del T2 (Fig.

R30D). Es importante notar que este dato es también contrario al incremento global del tamaño entre ambos tejidos, ya que el T2 aumenta su diferencia de tamaño respecto al T3 dentro del mismo período para formar una mosca adulta, en la cual casi todo el notum pertenece al T2. También es contrario a lo que ocurre en los apéndices, donde las células son de tamaño similar entre ambos discos en estadio de larva 3, pero sufren un incremento desigual durante la pupación, resultando las de ala mucho mayores que las del halterio, las cuales apenas crecen (Roch y Akam, 2000).

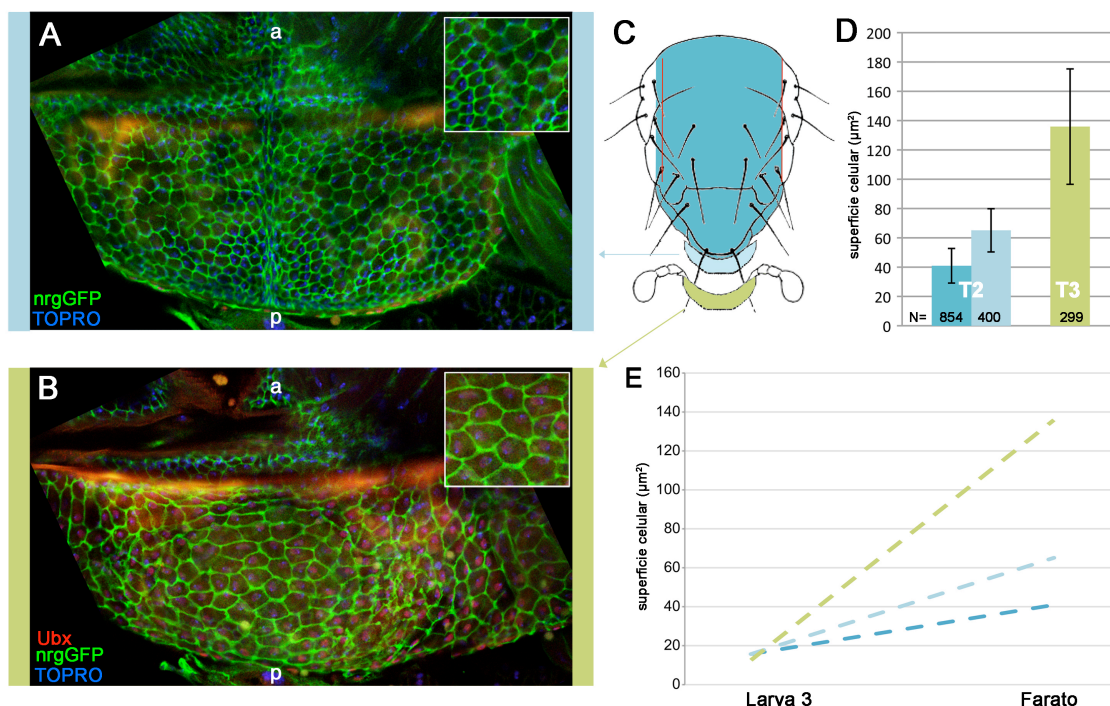


Figura R30. Estimación de la superficie celular en el metanotum adulto.

(A,B) Imágenes de la vista dorsal del fragma mesotorácico correspondientes al T2 y al T3, respectivamente (esquematizado en C). A simple vista se puede apreciar que el tamaño celular (inferido a partir del perímetro celular marcado en verde por la expresión de la línea *nrg*-GFP) es claramente más grande en las células del T3, cuyos núcleos expresan Ubx (rojo). a señala anterior y p, posterior. (D) Representación de los valores de tamaño celular medios en el notum de *Drosophila* (a excepción de las regiones cercanas al hinge). Se puede observar como las células del fragma T2 (azul claro) son bastante más grandes que las del resto del mesonotum (azul oscuro). Las células del metanotum son mucho más grandes que las anteriores ($T3/T2_{\text{fragma}}=2,09$; $T3/T2_{\text{global}}=3,32$). A pesar de que la dispersión de los valores en el T3 es mucho mayor que en el T2, las diferencias encontradas son significativas estadísticamente. (E) Evolución temporal de los tamaños celulares de las regiones estudiadas. Sólo se registraron los tamaños iniciales (tercer estadio larvario) y finales (faratos).

rB3. Estimación del número de células en meso y metanotum

Los resultados anteriores muestran que en el adulto, el tamaño de las células del T3 es mucho mayor que el de las células del T2. Dado que el T3 es mucho más pequeño que el T2, si además sus células son más grandes, el número de células que componen esta estructura debe ser mucho menor del esperado y por lo tanto la diferencia de número celular entre T2 y T3 mucho más

grande que la observada en los discos. Por esta razón debe estarse produciendo un aumento en la diferencia de número celular entre ambos tejidos durante la pupación.

Como hemos mencionado anteriormente, el tejido presuntivo de notum en los discos imaginales de ala y halterio es de diferente tamaño, aproximadamente unas 3 veces mayor en el caso del disco de ala respecto al de halterio según se deduce de las imágenes del microscopio. Sin embargo, pensamos que tal vez estas estimaciones de tamaño pudiesen no ser correctas del todo, ya que están basadas en la medida de la superficie de ambas regiones cuando, como hemos mostrado antes, el tamaño de las células varía de una a otra. Además, si tenemos en cuenta que los discos son epitelios pseudoestratificados simples, podría ocurrir que una misma superficie dada enmascarara un número de células mayor a lo largo del eje Z en el disco de ala que en el de halterio, como parece ocurrir según se muestra las imágenes de la Fig. R31A y B. Si esto fuese cierto, podría ser que no se estuviera produciendo un crecimiento neto diferente entre T2 y T3 durante el desarrollo pupal, sino un mero reordenamiento celular en tejidos cuya diferencia en número de células existe previamente, ya en el estadio de larva 3 tardía.

Para resolver esta cuestión, valoramos la posibilidad de estudiar la densidad celular a lo largo del eje Z en ambos discos; sin embargo, pensamos que los resultados serían más confusos que intentar acometer la tarea de contar directamente el número celular en ambos discos, lo cual nos daría una idea inequívoca del tamaño real total de ambas estructuras, independientemente del volumen, superficie o disposición celular en cada caso.

Los resultados de este estudio indican que el número medio de células presente en la región presuntiva de notum, delimitada por el borde proximal de la expresión de la línea *iroquois-lacZ* (no mostrado), en los discos de tercer estadio larvario de ala y halterio está en torno a las 6.100 y 2.600 células, respectivamente (ver Materiales y Métodos) (Fig. R31). Mientras que estas estimaciones podrían contener un sesgo derivado del método de recuento, el cálculo de la proporción eliminaría dicho sesgo, e indica que el número de células del mesonotum sería aproximadamente algo más del doble que el del halterio, concretamente tendría 2,37 veces más células.

La combinación de los parámetros de tamaño celular y número celular en los discos de ala y halterio obtenidos nos permiten calcular la “diferencia aparente” de tamaño entre ambos tejidos, siendo esta de aproximadamente 3 veces mas grande el ala que el halterio ($2,37 \times 1,25$), lo cual coincide con las observaciones previas.

En función exclusivamente de los resultados obtenidos hasta ahora, si consideramos que el notum presuntivo del T2 en el tercer estadio larvario contiene unas dos veces y media más células que el T3, pero que las del T3 crecen aproximadamente el triple que las del T2 durante la pupación, el adulto debería poseer un mesonotum de un tamaño aproximadamente igual que el metanotum, lo cual es obviamente erróneo. De este razonamiento sacamos dos conclusiones

importantes: la primera es que para determinar las proporciones finales de meso y metanotum, el periodo pupal es determinante, y la segunda es que durante este periodo debe estarse produciendo un aumento de la diferencia del número de células entre T2 y T3 para explicar los tamaños finales en el adulto, el cual podría producirse mediante una mayor proliferación en el T2 o la muerte por apoptosis de parte de las células del T3.

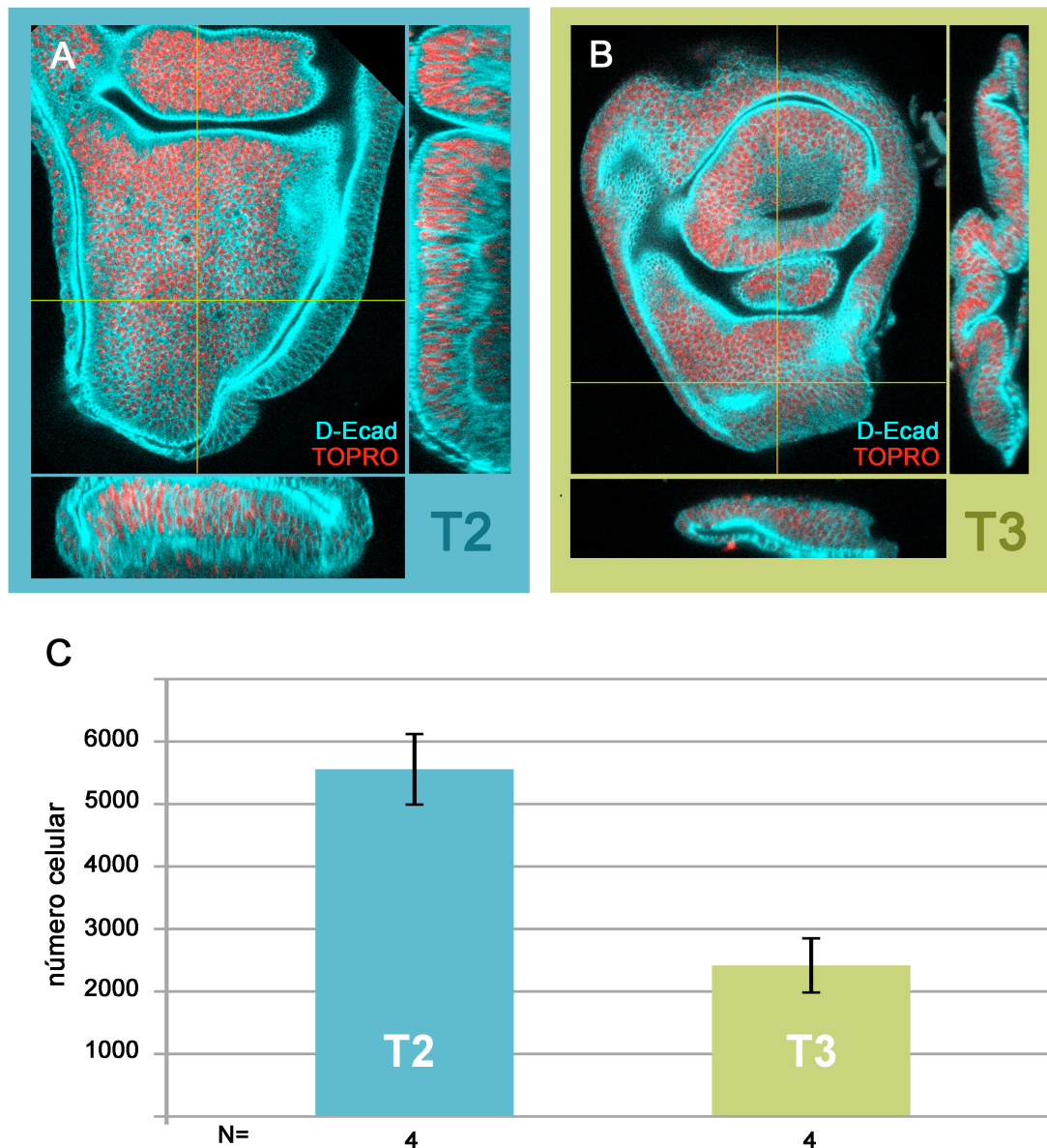


Figura R31. Recuento del número de células de la región presuntiva de mesonotum y metanotum en larva 3.

(A-B) Imágenes de diferentes planos de "stacks" de discos de ala y halterio de larvas *DE-cad-GFP*, a partir de los cuales se realizaron los cálculos de número celular (los núcleos aparecen marcados en rojo). Las regiones de interés (región presuntiva de notum) en ambos discos fueron delimitadas por la expresión de la línea *iro-lacZ*, que delimita esta región (no mostrado). (C) Representación gráfica de los números celulares medios de las regiones estudiadas. El número de células presente en la región presuntiva de mesonotum es aproximadamente 2,37 veces mayor que el de su región homóloga en el T3.

rB4. El mesonotum prolifera durante la metamorfosis pero no así el metanotum.

Este aumento de la diferencia del número de células entre mesonotum y metanotum, podría producirse bien por un aumento del número celular exclusivo del T2 o bien por una disminución del mismo en el T3. Para intentar discernir cuál de las dos posibilidades estaba operando en la metamorfosis, decidimos inducir clones de recombinación mitótica con marcadores neutros justo al principio de la pupación y visualizar su tamaño al final de la misma, en individuos faratos. Los clones se producen en respuesta a un choque térmico, no interfieren con el crecimiento ni la proliferación celular, y se producen en todos los tejidos de las moscas que reciben el tratamiento de temperatura. Por estas razones, el estudio del tamaño de los clones en diferentes tejidos revela posibles diferencias en la tasa de proliferación de ambos.

Indujimos estos clones en moscas de genotipo *y w hs-flp tub-Gal4 UAS-GFP; FRT82B tub-Gal80/FRT82B arm-lacZ* y visualizamos su tamaño en individuos justo antes de eclosionar, cuando todos los procesos de la metamorfosis han concluido. Sorprendentemente, fuimos capaces de recuperar muchos clones en diferentes regiones del T2 (Fig.32A), aunque apenas nunca en el fragma, ni en el T2 ni en el T3 (Fig.33 B). Sólo muy raras veces fuimos capaces de observar clones en el fragma, y en estos casos siempre fueron de muy pocas células (Fig. R33C, C'). Podría ocurrir que la frecuencia de clones fuera menor en esta estructura debido a que el tamaño del tejido que la forma durante la pupa es relativamente pequeño. Sin embargo, las imágenes de la figura 33 D-E eliminan esta posibilidad, ya que muestran cómo en un mismo individuo aparecen clones en estructuras de tamaño similar o menor al fragma (Fig. R32D), como son el capitellum (Fig. R32E,E') y el pedicellum del halterio o el scutellum del mesonotum, mientras que específicamente no se encuentran clones en el fragma (Fig. R32F,F'). Estas imágenes indican que existe una cierta proliferación durante la metamorfosis en tejidos del mesonotum, a excepción del fragma T2, y que esta proliferación está inhibida en el T3, presumiblemente por la acción de *Ubx*.

Aunque no hemos descartado aún la posibilidad de que haya una reducción en el número de células del metanotum durante la metamorfosis, creemos que la proliferación celular pupal del T2 es un mecanismo suficiente para explicar la diferencia de tamaño entre el mesonotum y el metanotum adultos de *Drosophila*. Aunque se ha señalado la existencia de proliferación en tejidos imaginales durante el desarrollo pupal, concretamente en la región presuntiva de ala (Schubiger y Palka, 1987; Milan et al., 1996, Martín et al 2009), este resultado es la primera evidencia de la existencia de proliferación en el notum de *Drosophila* durante la metamorfosis.

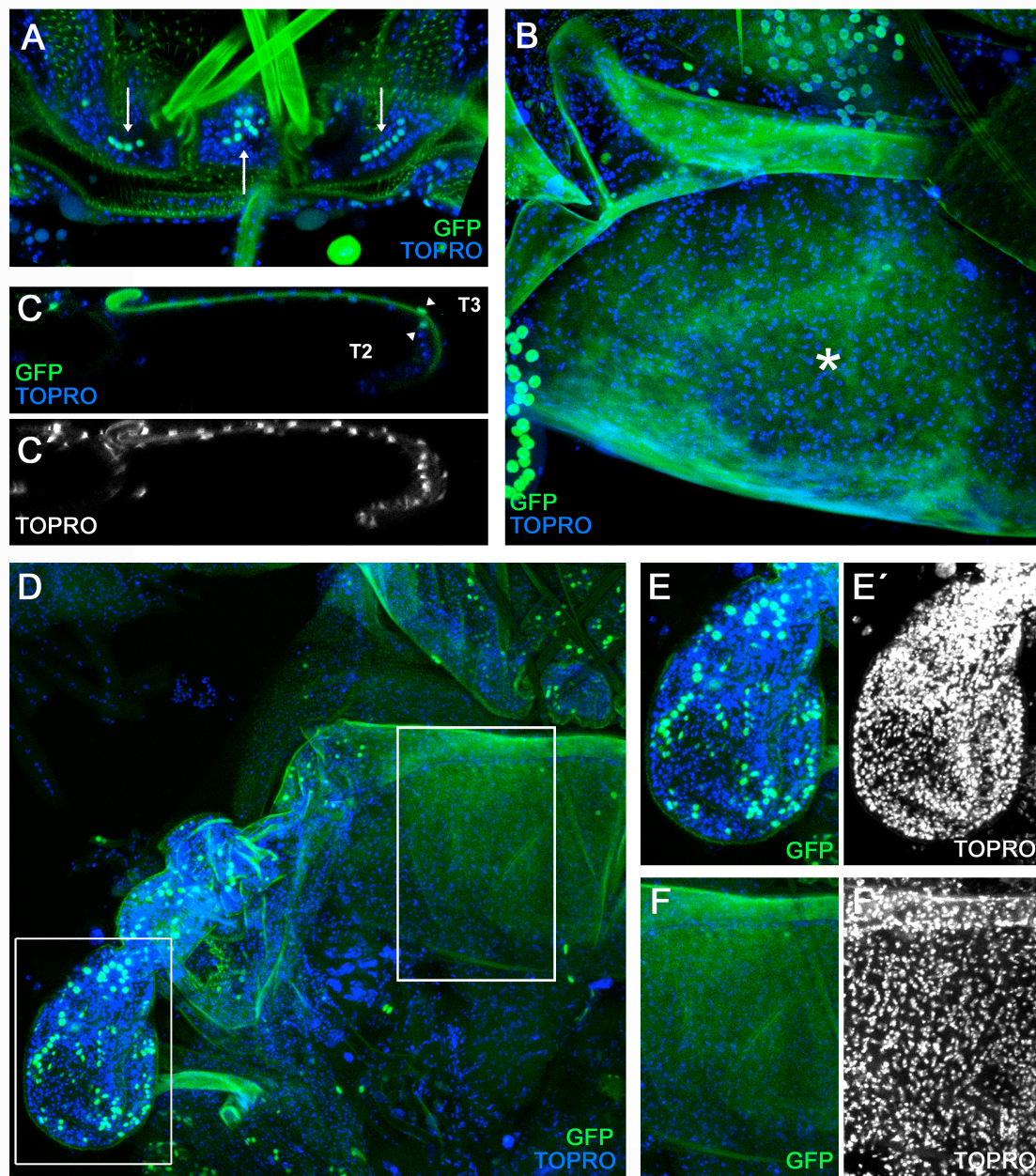


Figura R32. Las células del T2 proliferan durante la metamorfosis.

Imágenes de faratos adultos con genotipo *y w^{hs-flp} tub-Gal4 UAS-GFP; FRT82B tub-Gal80/FRT82B arm-lacZ*, en los cuales se indujeron clones de recombinación mitótica a las 0 horas después de la formación del pupario. (A) Vista de un scutellum (T2) mostrando tres clones diferentes (flechas). En el fragma mesotorácico apenas se producen clones (asterisco en B). Tan sólo alguna vez pueden aparecer clones tanto en el fragma T2 como en el T3 (cabezas de flecha en C, plano sagital). C' muestra en gris los núcleos presentes en el fragma. La ausencia de clones en el fragma no está originada por una menor probabilidad de recombinación debido a un número celular menor, ya que regiones próximas con igual o menor número celular, tales como el capitulo, escabelo o pedicelo del mismo individuo, todas derivadas también del disco imaginal de halterio, presentan gran cantidad de clones (D, ampliaciones de capitulo en F-F', fragma en G-G').

discusión

AUTO-REGULACIÓN DE *Ubx*

Ubx y *en* son dos genes homeóticos negativamente regulados por sus propios productos en los discos imaginales (Irvine et al., 1993; Guillén et al., 1995; Simmonds et al., 1995; Casares et al., 1997). Probablemente la función de este mecanismo de autorregulación sea la de controlar de una manera precisa las pequeñas fluctuaciones en los niveles de proteína durante el desarrollo, lo cual podría interferir en la expresión de los genes diana, que son muy sensibles a los niveles de proteína (Tour et al, 2005). Niveles mayores de proteína *Ubx* por ejemplo, reducen el tamaño del halterio (Smolik-Utlaut, 1990), lo que indica claramente una alteración en los procesos de diferenciación y crecimiento gobernados por *Ubx* en condiciones silvestres. Los niveles de expresión de *Ubx* son mucho mayores en el PS6 (que formará fundamentalmente el primer segmento abdominal) que en el PS5 (que desarrolla estructuras derivadas de discos imaginales). Es posible que se necesite una regulación precisa de los niveles de *Ubx* durante el desarrollo para que derivados de histoblastos y discos se desarrollen correctamente. Hemos comprobado que cuando este ajuste preciso en los niveles de proteína no tiene lugar, los dos genes son permanentemente inactivados, originando daños severos en la mosca.

Con nuestros experimentos hemos demostrado cómo este silenciamiento permanente constaría de dos etapas: una primera etapa “iniciadora” durante la cual niveles muy elevados de proteína homeótica llevarían al extremo la autorregulación negativa de *Ubx* provocando una parada total de la transcripción del gen; y una segunda etapa en la que, debido a esta parada de la transcripción, las proteínas del grupo Pc mantendrían este estado silenciado durante el resto del desarrollo. Si una vez superadas ambas fases, el aporte exógeno de la proteína homeótica cesara, la falta permanente de proteína *Ubx* endógena (ocasionada por el bloqueo permanente de su síntesis) en las células del disco de halterio induciría transformaciones de dicho apéndice en ala. Es por esta razón por la que sólo se observan estas transformaciones al sobreexpresar *Ubx* con aquellas líneas Gal4 cuyos dominios de expresión varían con el tiempo. Aquellas otras líneas o combinaciones mutantes en las cuales los niveles elevados de *Ubx* son mantenidos de manera constante producirían apéndices de tamaño reducido (Smolik-Utlaut, 1990)

Esta represión permanente depende de la acción del grupo de proteínas Polycomb, las cuales son responsables de mantener el estado inactivo de los genes homeóticos fuera de su dominio de expresión. Numerosas publicaciones han demostrado que la transcripción a través de un PRE en las secuencias reguladoras de los genes Hox *abd-A* o *AbdB* provoca un silenciamiento ineficiente de las proteínas Pc y la consiguiente expresión ectópica de dichos genes, causando transformaciones homeóticas (Bender y Fitzgerald, 2002; Hogga y Karch, 2002; Rank et al., 2002; Schmitt et al., 2005). Nuestra hipótesis es que el fenómeno de silenciamiento permanente de *Ubx* es consecuencia del mecanismo opuesto: la activación de un PRE mediante el ensamblaje de los complejos Polycomb, debidos a una falta de transcripción a través del mismo. Existe un PRE localizado en el intrón largo de *Ubx* (Chiang et al, 1995; Orlando et al., 1998), y había sido previamente sugerido que la transcripción de *Ubx* a través de este PRE podría contribuir a la inactivación de complejos de represión de Polycomb (PRC) (Papp and Müller, 2006). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis. Si se suprime la transcripción de *Ubx*, como ocurre cuando nosotros aumentamos los niveles de proteína, entonces los PRCs se activan en este PRE y mantienen de manera permanente el estado silenciado de *Ubx* (Figura 1).

Mecanismo de represión

El mecanismo molecular por el cual la transcripción de *Ubx* inactivaría los complejos Polycomb no está clara. Estudios anteriores han propuesto que la transcripción a través de un PRE imposibilita la unión de algunas proteínas PcG al DNA, impidiendo por tanto el subsiguiente ensamblaje de los PRC en ese punto, y eliminando por tanto la función de Pc (Bender y Fitzgerald, 2002; Hogga y Karch, 2002; Rank et al., 2002; Schmidt et al., 2005). Sin embargo, otros estudios han demostrado que las proteínas de PRC se encuentran unidos al PRE de *Ubx* en los discos imaginales de halterio, donde la transcripción del gen homeótico está activa (Papp y Müller, 2006). Matizando este dato se ha visto que la unión de algunas de estas proteínas está reducida en dichos discos

cuando se compara con los de ala, sugiriendo que tal vez *Ubx* podría estar disminuyendo de algún modo la capacidad de ensamblaje de las diferentes proteínas Pc a nivel del PRE (Papp y Müller, 2006). Tanto si la transcripción de *Ubx* afecta a la unión de las proteínas PcG al DNA o únicamente a su activación, nuestros resultados parecen apoyar la idea de que la transcripción en sí misma es un requisito para prevenir el silenciamiento de *Ubx*, y que por tanto la ausencia de la misma, provocada en nuestro caso por uno elevados niveles de proteína homeótica, conduce a una represión permanente.

Los resultados obtenidos con la línea *Ubx-Gal4^{SS.2}*, insertada cerca del PRE de *bx*, son también relevantes para nuestra hipótesis. Cuando utilizamos esta línea para sobreexpresar *Ubx* observamos una represión conjunta tanto de la proteína nativa *Ubx* como de la propia línea en el compartimento anterior del disco imaginal de halterio, donde se expresa *UbxGal4^{SS.2}*. Creemos por lo tanto que en primer lugar los altos niveles de proteína *Ubx* inactivan la transcripción del gen *Ubx* endógeno en esas células (Fig. D1A), lo que es seguido de la activación de los complejos PcG (Fig. D1B), los cuales empiezan por condensar las regiones de cromatina cercanas al mismo (Fig. D1)(revisado en Müller y Kassis, 2006). La línea *Gal4*, que se encuentra en estas regiones, queda por lo tanto inactivada rápidamente.

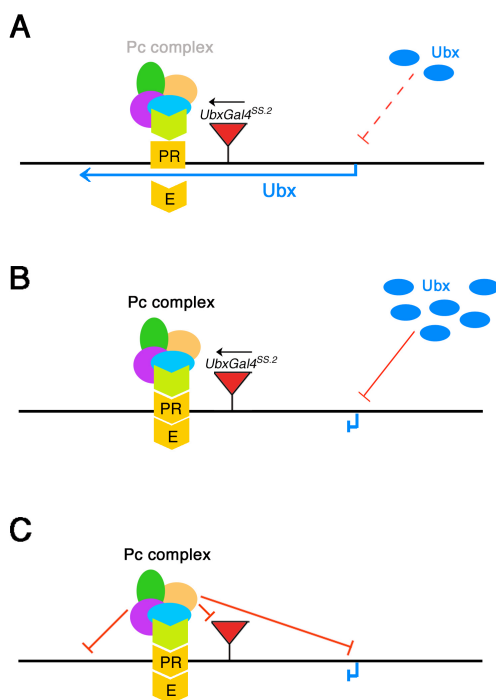


Figura D1. Modelo del mecanismo de represión permanente. Concentraciones elevadas de la proteína *Ubx* (A) bloquearían la transcripción del gen *Ubx* endógeno (B). La ausencia de transcripción a través del PRE activaría los complejos Pc que mantendrían la represión de la transcripción de manera permanente (C).

Este resultado contrasta con lo que ocurre cuando sobreexpresamos *Ubx* utilizando otras líneas *Ubx-Gal4* localizadas en regiones más distantes del PRE de *bx* (de Navas et al, 2006); en estos casos apenas se produce represión de la expresión de la proteína *Gal4* en los discos de halterio. Nuestra hipótesis para explicar estos otros casos es que, por encontrarse cerca del promotor de *Ubx*, estas líneas responden transcripcionalmente a los niveles de *Ubx* de la misma manera que el

gen endógeno. Siguiendo esta idea, al aumentar los niveles de *Ubx* por la actividad de las inserciones Gal4, el promotor de *Ubx* respondería reduciendo su actividad y disminuyendo la transcripción del gen endógeno, así como de las propias líneas Gal4. Esto provocaría una bajada de los niveles totales de proteína de *Ubx* presentes en las células, que causaría una recuperación de los niveles de actividad del promotor y por tanto de transcripción del gen endógeno y de la expresión del gen Gal4 incluido en la inserción. Según este modelo, nunca llegarían a alcanzarse los niveles de proteína *Ubx* suficientes como para ocasionar una parada total de la transcripción del gen, que desencadenaría la activación de los PRC en el PRE y el “cierre” de la cromatina circundante. Se alcanza por el contrario un equilibrio entre los niveles de proteína endógena y exógena, que probablemente no diste mucho de los niveles silvestres en un disco normal, provocados por la integración de dos fuentes distintas de *Ubx* dentro del mismo promotor.

Estudios recientes que también han analizado estos mecanismos proponen que la respuesta del gen *Ubx* podría ser descompuesta en la integración de la respuesta individual de cada "enhancer" a los niveles de proteína en cada célula (Crickmore and Mann, 2009). La represión permanente de *Ubx* que nosotros hemos observado estaría ocasionada por un cierre completo de la cromatina en el locus de *Ubx*. No obstante, si los niveles de expresión de *Ubx* se elevan sutilmente, en moscas con varias dosis extra de *Ubx*, podrían producirse inactivaciones de sólo parte de los enhancers de este gen (Crickmore and Mann, 2009). De hecho, la respuesta de estos enhancers a los niveles de *Ubx* presentes en las células variaría de unos a otros, de manera que a cada concentración concreta de proteína *Ubx* se silenciarían unos enhancers determinados (Crickmore and Mann, 2009).

Como hemos demostrado, la inhibición transitoria de la transcripción es un requisito imprescindible para el establecimiento del silenciamiento permanente. Sin embargo, parece no ser suficiente, ya que la expresión ectópica tanto de *AbdB* como de *abd-A* consigue reprimir la transcripción de *Ubx*, pero no hacerla permanente en el tiempo. Este distinto comportamiento entre *Ubx*, *abd-A* y *AbdB* no depende ni del extremo C-terminal, el cual contiene un bloque conservado de alaninas y glutaminas en las tres proteínas homeóticas (Galant et al., 2002; Ronshaugen et al., 2002), ni del Hexapéptido, presente en *Ubx* y *abd-A*, aunque sí que podría estar relacionado con el dominio *UbdA*. La proteína *Ubx^{UbdA}* se comporta como la proteína *Ubx* endógena, ya que es capaz de inducir transformaciones de alas en halterios y de reprimir la expresión de genes específicos del desarrollo del ala (Merabet et al., 2007). Sin embargo, es incapaz de establecer una represión permanente de *Ubx* siguiendo las condiciones de nuestro protocolo estándar. Es posible que la falta de represión permanente que observamos al sobreexpresar *AbdB* o *Ubx^{UbdA}* se deba a que ambas proteínas no sean capaces de bloquear por completo la transcripción del gen *Ubx* endógeno, permitiendo unos niveles de transcripción tan bajos como para no ser detectados en nuestras tinciones inmunohistoquímicas pero suficientes para impedir el ensamblaje de las proteínas Pc a nivel del PRE de *bx* y la consiguiente

heterocromatinación de la zona. De hecho, la proteína Ubx^{UbdA} necesita estar presente en las células durante mucho más tiempo que las proteínas *Ubx* o *AbdA* para conseguir reprimir la transcripción del gen endógeno (al menos 5 días a 29°C). Otra posible explicación podría ser que el dominio *UbdA* sí fuese necesario para la colaboración con las proteínas *Pc* para establecer de manera permanente el silenciamiento de *Ubx*.

Control de la expresión de *Ubx* en PS5

Si es cierto, por tanto, que la proteína *Ubx* es necesaria para establecer una represión del gen mediada por *Pc*, y no basta con inhibir la transcripción de maneras alternativas, este mecanismo de regulación podría estar presente en estructuras donde *Ubx* es transcripcionalmente activo, como el disco imaginal de halterio. Obviamente, en segmentos anteriores al parasegmento 5, donde *Ubx* no se expresa nunca, el mantenimiento del estado inactivo del gen homeótico no puede depender de su propia proteína. Sin embargo, dentro de este contexto, es importante mencionar un caso específico de represión de *Ubx*: aquel que ocurre en el compartimento posterior del disco de ala. Durante el desarrollo embrionario el límite anterior de expresión de *Ubx* es el parasegmento 5, que equivale al compartimento T2p. Esto significa que el compartimento posterior del disco imaginal de ala (que pertenece al T2p) debería mostrar expresión de *Ubx* tanto en el apéndice como en el mesonotum; sin embargo, no ocurre así. Por el contrario, el análisis de mutaciones *bx* y *abx*, que regulan la expresión de *Ubx* en el PS5, demuestra que la parte proximal posterior del disco de ala (parte del PS5), que da lugar al postnotum, requiere *Ubx* en estadios tempranos del desarrollo (Casanova et al., 1985). Nuestros resultados de análisis de linaje, además, sugieren asimismo que *Ubx* se expresa en células del primordio imaginal de ala durante el desarrollo embrionario temprano, puesto que en las combinaciones en que se marca con un marcador cuticular las células que alguna vez expresaron *Ubx* se observa el compartimento posterior del ala marcado.

Nuestras observaciones muestran cómo, efectivamente, las células del T2p expresan *Ubx* hasta el estadio 12 embrionario, momento a partir del cual los niveles de proteína comienzan a descender hasta ser prácticamente indetectables en el estadio 15 embrionario y posteriormente. Este significa, por tanto, que en el compartimento posterior del disco imaginal de ala existe una represión de *Ubx* permanente dependiente de *Pc*, que ocurre tras una expresión transitoria de *Ubx* en el periodo embrionario, similar al mecanismo que proponemos. De hecho, ciertas combinaciones mutantes hipomorfas para *Ubx* provocan la activación de regiones reguladoras de *Ubx* incluídas en la línea 35UZ, que pasa a expresarse ectópicamente en los compartimentos posteriores de algunos discos de ala de estas moscas, en vez de estar permanentemente inactivada en dichas células como ocurre en los individuos silvestres. De cualquier forma, parece que la expresión temprana de *Ubx* en el compartimento posterior del “pouch” del disco de ala no es

necesaria para su desarrollo, ya que clones mutantes para *Ubx* inducidos en blastodermo no producen ningún efecto en esta región (Morata y Kerridge, 1981; Kerridge y Morata, 1982).

Esta expresión transitoria temprana de *Ubx* podría conferir propiedades específicas a estas células, ya que en mutaciones que inactivan parcialmente a alguno de los genes del grupo *Pc* (por ejemplo en individuos *Pc³/+*), se detecta expresión ectópica de *Ubx* en el disco de ala, pero mucho más frecuentemente en el compartimento posterior que en el anterior o que en otros discos imaginales más anteriores (Cabrera et al., 1985). Esto sugiere que el compartimento posterior del disco de ala tiene de alguna manera una mayor tendencia a activar *Ubx* cuando las condiciones de represión de *Ubx* disminuyen. Posiblemente esto esté ocasionado por un estado de condensación de la cromatina diferente entre ambos compartimentos. Pensamos que, a pesar de que *Ubx* esté permanentemente reprimido por acción de las proteínas PcG en ambos compartimentos, tal vez el estado de la cromatina a nivel del locus de *Ubx* sea distinto en función del mecanismo mediante el cual se originó ese silenciamiento permanente, bien por una expresión transitoria de *Ubx*, como ocurre en el compartimento posterior, bien por la manera normal de inactivación de los genes homeóticos mediada por *Pc*.

Quisimos intentar demostrar si efectivamente esta expresión temprana de *Ubx* era necesaria para su posterior inactivación durante el resto del desarrollo. Sin embargo, todas las estrategias que abordamos no nos permitieron resolver esta cuestión. El problema común a todas ellas fue la imposibilidad de eliminar la expresión de *Ubx* de forma transitoria en estadios tan tempranos, o bien por no existir una línea Gal4 adecuada que promoviera la suficiente expresión del RNAi de *Ubx*, o bien porque el RNAi de *Ubx* no funciona bien en el embrión.

Autoregulación en otros genes

El gen *en*, al igual que *Ubx*, se regula negativamente por su propio producto en los discos imaginales (Guillén et al., 1995; Simmonds et al., 1995; Tabata et al., 1995) y también por las proteínas del grupo *Pc* (Busturia y Morata, 1988; Moazed y O'Farrell, 1992; McKeon et al., 1994). Al igual que ocurre con *Ubx*, se ha demostrado la existencia de un PRE localizado anteriormente a su punto de inicio de transcripción (Kassis et al., 1991; Kasssis, 1994), así como que hay transcripción a través del mismo (Schmitt et al., 1995). Nuestros resultados muestran que altos niveles de proteína En reprimen permanentemente la expresión del gen endógeno en el disco de ala. Pensamos por tanto que, de manera análoga a lo que ocurre con *Ubx*, En reprimiría la transcripción a través del PRE y dispararía una represión permanente al posibilitar la unión o la activación de los PRC a nivel del PRE.

Existen numerosos estudios que atribuyen mecanismos de autorregulación negativa a muchos genes en *Drosophila*, como es el caso de *Distal-less* (Gorfinkiel et al., 1997), *labial* (Chouinard y Kaufman, 1991), *Supressor of Hairless* (Barolo et al., 2000), *brinker* (Moser y Campbell,

2005) y *trithorax-like* (Bernués et al., 2007). Pero también existen genes con esta capacidad en otros organismos como el caso de *six3* en el ratón (Zhu., et al., 2002) o *gooseoid* en *Xenopus* (Danilov et al., 1998). Estos ejemplos apoyan la idea de que muchos genes implicados en el desarrollo animal necesitan mantener estables sus niveles de expresión durante el desarrollo de un individuo, puesto que alteraciones en los niveles de proteínas pueden tener efectos deletéreos. Sería muy interesante investigar si el mecanismo que hemos descrito para el caso de *Ubx* y en *Drosophila* tiene lugar también en otros genes y otros organismos.

DESARROLLO DEL TÓRAX DE *Drosophila*

La combinación de la forma y el tamaño de cada segmento o región dentro de un organismo genera una serie de proporciones características que han de ser constantes entre todos los individuos de una misma especie. Los mecanismos y genes implicados en el desarrollo de cada segmento son en muchos casos similares, siendo la acción específica de un gen Hox determinado la que modifica estos mecanismos de manera característica, dirigiendo el crecimiento y la diferenciación de cada segmento de manera específica y diferente al resto. Cómo los genes Hox son capaces de generar la diversidad de estructuras a lo largo del eje anteroposterior es cuestión importante en la Biología del Desarrollo contemporánea.

Regulación del crecimiento del halterio por *Ubx*

Aunque cada vez son más los organismos en los que se estudia la función de los genes hox y su relación con el tamaño, tanto en insectos (Mahfooz et al., 2007; Khila et al., 2009) como en otros grupos de animales más distantes filogenéticamente como vertebrados (revisado en Mallo et al., 2009), los apéndices dorsales de *Drosophila* constituyen uno de los modelos más explotados en el estudio de la función homeótica hasta hoy. Alas y halterios son estructuras homólogas que experimentan un desarrollo similar, pero son muy distintas en cuanto a forma y tamaño en la mosca adulta. La acción de *Ubx* en los halterios es necesaria y suficiente para dirigir su desarrollo y diferenciarlo del de las alas, que se desarrollan en ausencia de la proteína homeótica. *Ubx* controla numerosas vías de señalización implicadas en el desarrollo de ambos apéndices generando una serie de características a nivel de celular y de órgano específicas de los halterios (Weatherbee et al., 1998), entre ellas, el tamaño.

Ubx regula este parámetro durante todo el desarrollo. Los primordios embrionarios a partir de los cuales se forman los discos imaginales de ala y halterio presentan una ligera diferencia de tamaño desde su establecimiento en el embrión. En ese momento, en torno al estadio 15 y en

base a la expresión observada de la línea *escargot-lacZ*, los primordios de ala y halterio parecen contener alrededor de 20 y 16 células de media, respectivamente (Luis de Navas, comunicación personal). *Ubx* es responsable de dicha diferencia, puesto que embriones con mutaciones de ganancia de función del gen homeótico presentan primordios de ala con un número de células similar al del halterio. Al final del desarrollo embrionario, sin embargo, el número de células presente en el primordio de alas se encuentra en torno a las 40 células por unas 20 en el halterio (Morata y García-Bellido, 1976; Lawrence y Morata, 1977; Lawrence y Morata, 1979; Bate y Martínez-Arias, 1991; Luis de Navas, comunicación personal.). De esta manera, durante la última fase del desarrollo embrionario se produce un aumento de tamaño diferencial del primordio del T2 dorsal ala respecto al del T3 dorsal que no depende de proliferación celular (datos sin publicar), la cual no se reinicia hasta el primer estadio larvario (Madhavan y Schneidermann, 1977). Desconocemos hasta el momento el mecanismo por el cual se produce este incremento, ni cómo puede estar influenciado por *Ubx*.

Al final de la embriogénesis por tanto, el tamaño del disco de ala aproximadamente duplica al del halterio. Sin embargo, esta diferencia no es suficiente para explicar la diferencia de tamaño final existente entre ambos apéndices, ala y halterio. Al final del desarrollo larvario, los discos imaginales de ala son aproximadamente 4 o 5 veces más grandes que los de halterio, estando estimado su número celular en 50.000 y 10.000, respectivamente (Crickmore y Mann, 2006; Luis de Navas, comunicación personal), lo cual pone de manifiesto que el crecimiento relativo del primordio de ala frente al de halterio se incrementa también durante el desarrollo larvario. Estudios recientes describen cómo *Ubx* es capaz de modular la actividad de la vía de Dpp en el disco de halterio (Crickmore y Mann, 2006; de Navas et al., 2006; Crickmore y Mann, 2007; Makijhani et al., 2007), una vía esencial para el crecimiento del disco (revisado en Day y Lawrence, 2000). Tanto la síntesis y secreción de Dpp, como su movilidad y recepción a lo largo del eje dorsoventral se ven disminuidas en los discos de halterio provocando un menor crecimiento de este órgano. Mediante el control de un morfógeno difusible como Dpp, *Ubx* controla pues el tamaño del halterio de una manera no autónoma celular durante el desarrollo larvario (Crickmore and Mann, de Navas et al., 2006; 2006; Makijhani et al., 2007).

Durante el desarrollo pupal, las diferencias de crecimiento entre los primordios de ala y halterio aumentan. Estas regiones presentan al comienzo de la pupación un tamaño celular similar (Roch y Akam, 2000). Sin embargo, durante la segunda mitad de la metamorfosis se produce un incremento notable del tamaño de las células de ala, llegando a ser aproximadamente diez veces superior al que tenían en el disco imaginal maduro, incrementando de esta forma, y de manera dramática, el tamaño del ala adulta. Esta gran expansión celular está inhibida en los halterios debido a la acción de *Ubx*. La diferencia de tamaño entre el ala y el halterio de *Drosophila* es por tanto resultado de la acumulación de un crecimiento desigual entre ambos apéndices durante todo el desarrollo, incluyendo variaciones en proliferación y tamaño celular gobernadas por *Ubx*.

Crecimiento pupal del notum

Si bien la regulación del tamaño del ala, y los mecanismos que determinan su crecimiento han sido objeto de intensos estudios (Affolter y Basler, 2007), la parte proximal del disco imaginal de ala (que formará el notum), que también crece, no ha recibido tanta atención, en parte quizás porque Dpp no parece tener un papel relevante en el control de su tamaño, en parte porque hasta ahora no se sabía exactamente las dimensiones ni la ubicación del mesanotum adulto. Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen el primer estudio detallado de esta estructura. Nuestras imágenes muestran cómo el metanotum forma, conjuntamente con una porción del postnotum del T2, una invaginación de la pared corporal hacia el interior de la cavidad torácica de *Drosophila*, solo antes observada por Ferris (Ferris, 1950)

En relación al control ejercido por *Ubx*, previo al momento de la pupación, el mayor tamaño del disco de ala frente al de halterio es patente no solo en la región presuntiva del apéndice, sino también en el notum. Además, los derivados en el adulto de las regiones proximales de ambos discos presentan diferencias de tamaño incluso mayores que las observadas entre ala y halterio. En este trabajo hemos intentado descifrar los mecanismos que promueven dicha diferencia.

Nuestros resultados indican que la generación de esta gran diferencia de tamaño se debe a dos factores: el número celular y el tamaño celular. En primer lugar, a diferencia de lo que ocurre en las regiones del “pouch” (Roch y Akam, 2000), el tamaño celular sí varía entre las regiones del notum de ambos discos (Fig. D2). Las células del mesonotum son más grandes que las del metanotum en discos de tercer estadio larvario. En segundo lugar, el número de células en el mesonotum es aproximadamente el doble que en el metanotum (Fig. D2), siendo un dato éste que recuerda a la diferencia existente entre ambos órganos al final del desarrollo embrionario. No obstante, en el embrión aún no están especificadas, en los discos imaginales nacientes, las diferentes regiones que darán lugar a las diferentes estructuras de los apéndices adultos: notum, axila y apéndice. Por este motivo, no sabemos si las proporciones relativas entre cada una de estas regiones presuntivas en el disco maduro son las mismas que en el disco embrionario. Bajo la suposición de que las proporciones se mantuviesen, podríamos interpretar que no se produce un crecimiento diferencial de la región presuntiva de notum durante el desarrollo larvario, ya que la proporción de número de células existente entre ambas regiones es la misma que en el embrión tardío. No se ha estudiado si *Ubx* regula la vía de Dpp en este dominio del disco, pero de cualquier forma esta vía no tiene un papel relevante en su crecimiento.,

Si combinamos los cálculos de número celular y tamaño celular encontramos que el tamaño aparente del mesonotum es aproximadamente tres veces mayor al del metanotum al final del desarrollo larvario, lo cual coincide con las observaciones de los discos al microscopio. El incremento de la diferencia de tamaño entre ambas regiones presuntivas respecto del embrión podría deberse por tanto, exclusivamente a los cambios en el tamaño celular.

Haya o no un incremento real en la diferencia del número de células durante el desarrollo de la larva, la proporción existente entre el tamaño de ambos segmentos antes y después de la metamorfosis es muy distinta. Aunque no hay estimaciones del tamaño del meso y metanotum en la mosca adulta, su inspección “de visu” permite calcular que la diferencia entre ambos es aproximadamente de diez o quince veces: el mesonotum es prácticamente la totalidad del notum observable mientras que el metanotum es una pequeña banda de tejido que queda dentro de la cavidad torácica de *Drosophila*. Este hecho pone de manifiesto la existencia de un crecimiento mucho mayor en el T2 que en el T3 durante el desarrollo pupal. Aunque no podemos descartar la contribución de mecanismos que disminuyan el número celular en el T3 tales como la apoptosis o la delaminación de células, tan sólo la proliferación celular encontrada exclusivamente en las células del mesonotum sería suficiente para explicar la diferencia de tamaño generada durante dicho periodo.(Fig. D2). Hasta el momento hemos intentado sin éxito, debido a la complejidad que plantea una estructura como el fragma mesotorácico, estudiar la posible implicación directa o indirecta de *Ubx* sobre la inhibición de la proliferación de las células del metanotum durante la metamorfosis.

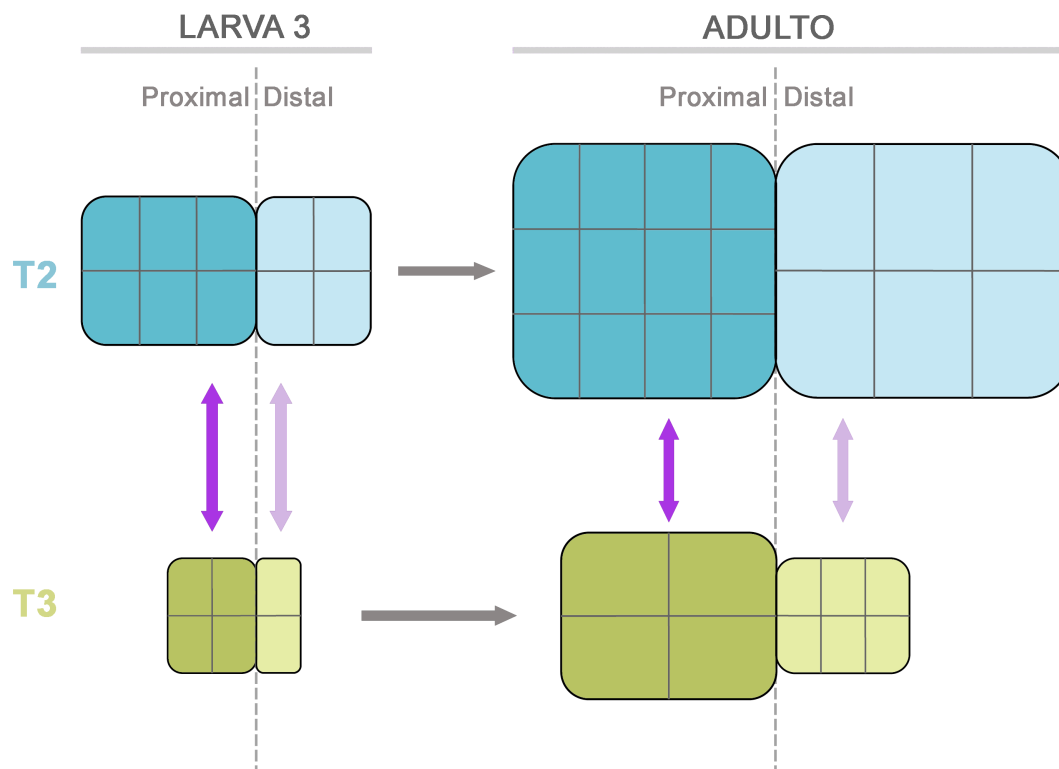


Figura D2. Representación de los tamaños de T2 y T3 durante el desarrollo pupal.

Las estrategias de crecimiento que muestran T2 (azul) y T3 (verde) son distintas, y varían dentro de cada segmento entre sus regiones proximal (oscura) y distal (claro). El mesonotum alcanza su tamaño adulto principalmente mediante proliferación celular, mientras que las células del metanotum no proliferan, sino que aumentan su tamaño. En las regiones proximales se da la situación opuesta: las células del ala sufren una gran expansión celular, la cual está inhibida en las células del halterio. (Roch y Akam, 2000). (Ni el tamaño celular ni el número de células en cada zona está a escala en esta figura)

El estudio de la evolución del tamaño celular aporta, sin embargo, unos resultados por completo inesperados. El metanotum adulto, a pesar de ser una estructura mucho más pequeña que el mesonotum, está compuesta por células con un tamaño muy superior al de las células del mesonotum, ocasionado por un crecimiento durante la pupación mucho mayor que el experimentado por las células del T2 (Fig. D2). Esto plantea dos reflexiones muy interesantes: la primera, que la actividad de *Ubx* promovería, de manera directa o indirecta, un mayor crecimiento del tamaño celular frente a su ausencia, en las células del mesonotum, lo cual es sorprendente ya que en la región distal del disco su función es la opuesta. En general, podemos decir que en *Drosophila*, *Ubx* induce un crecimiento menor de los tejidos, ya sea por un mecanismo u otro, si bien la pata metatorácica, que expresa *Ubx*, no es mayor que las protorácica o mesotorácica. No es ésta, sin embargo, una característica universal de *Ubx*, ya que al menos en dos especies de insectos distintas: *Oncopeltus fasciatus*, y *Acheta domesticus*, *Ubx* es responsable del mayor crecimiento que experimentan los segmentos de la tibia, en el caso del primero, y de toda la pata del T3 en el caso del segundo, en comparación con las del T3 (Mahfooz et al., 2007). En el caso de *Gerris buenoi*, *Ubx* promueve simultáneamente un mayor tamaño de la pata mesotorácica y menor de la metatorácica en el escarabajo acuático (Khila et al., 2009).

La segunda, que el tipo de crecimiento que experimentan las distintas regiones del disco de halterio durante el desarrollo pupal, y por tanto el control que ejerce sobre ellos *Ubx*, es diferente. Durante la pupa, las células del apéndice apenas incrementan su tamaño (Roch y Akam, 2000) contribuyendo al aumento de la diferencia de tamaño entre las alas y halterios adultos. Sin embargo, a diferencia de éstas, las células del notum de los discos de halterio aumentan su volumen de manera dramática. Aún más, como muestran nuestros resultados, también la proliferación celular es distinta en ambas regiones, estando inhibida específicamente en el notum, pero no así en el "pouch". Existe por tanto una regulación de ambos procesos distinta en las células correspondientes a la región distal o proximal, aunque ambas estarían controladas por *Ubx*, lo cual pone de manifiesto la necesidad de encontrar otro factor que actúe en combinación con *Ubx* para inducir o inhibir el crecimiento en cada región del disco. Los candidatos para esta función serían cualquier gen que se expresase exclusivamente en la región del notum o del "pouch" del disco de halterio. En base a este criterio, entre los posibles genes candidatos se encontrarían *homothorax*, *extradenticle* (ver Introducción), o *teashirt* (Wu y Cohen, 2002), que se expresan (o se encuentran en el núcleo, en el caso de *extradenticle*) en todas las células del disco excepto en aquellas pertenecientes al "pouch", o genes como *nubbin* o *rotund*, que se expresan específicamente en el "pouch" y parte de la axila (Williams et al., 1993; Ng et al., 1996). Hth promueve la importación de Exd al núcleo de las células, donde es funcionalmente activo (Aspland y White, 1997; Rieckhof et al., 1997) y ambos son cofactores de *Ubx* necesarios para su función, lo cual les convierte en los mejores candidatos (principalmente Exd) para modificar la acción de *Ubx* a lo largo del eje proximo-distal.

Dos estrategias de crecimiento en el notum de *Drosophila*

En otro plano distinto, dejando de lado la diferencia de tamaño existente entre el meso y el metanotum, ambos son estructuras homólogas que derivan de discos imaginales con un tipo de crecimiento similar durante el desarrollo. Sin embargo, durante la pupación, las estrategias de crecimiento que cada una sigue para lograr su tamaño final, son antagónicas: mientras que el mesonotum prolifera extensivamente, el metanotum crece en tamaño celular, pero ambas estarían controladas por *Ubx*. Esta es la primera evidencia de que un gen Hox es capaz de cambiar por completo el plan de crecimiento de un segmento para diferenciarlo del de un segmento homólogo dentro del mismo tagma y por mecanismos diferentes según la región que se estudie. A este respecto, es interesante referir lo que ocurre en el abdomen, donde también se expresa *Ubx* (en su primer segmento abdominal). El abdomen posee un tipo de crecimiento distinto al del tórax, dividiéndose los histoblastos (precursores de los segmentos abdominales) solo durante la pupación (Madhavan y Schneidermann, 1977; Madhavan y Madhavan, 1980; Ninov et al., 2007). Sin embargo, no está claro que su diferente crecimiento esté controlado de forma autónoma celular por los genes Hox *abd-A* y *Abd-B* (que se expresan en el abdomen), ya que la expresión ectópica de *abd-A*, por ejemplo, en células de la región presuntiva del notum del disco de ala, induce en las mismas la diferenciación de elementos típicos de abdomen, pero no afecta a los parámetros de crecimiento, que siguen siendo característicos del disco imaginal (datos no mostrados). La actividad de los genes Hox en el control del crecimiento, por tanto, si bien muy importante para diferenciar el tamaño de estructuras de las distintas especies, se basa en distintos mecanismos que nuestro trabajo ha intentado comenzar a esclarecer.

conclusiones

1) Altas concentraciones celulares de *Ubx* provocan un bloqueo de la transcripción del gen *Ubx* endógeno, lo cual promueve la aparición de grupos de células sin proteína Ubx que se desarrollan como células del T2, generando fenotipos asociados con la pérdida de función del gen homeótico.

2) El bloqueo de la transcripción, una vez generado, se hace independiente de la concentración de Ubx presente en las células, y es mantenido de manera permanente mediante la acción de las proteínas del grupo Pc. De este modo, una sobreexpresión transitoria de *Ubx* es suficiente para generar una inhibición permanente de su propia síntesis, y desarrollar fenotipos de pérdida de función.

3) La inhibición permanente de *Ubx* es heredada por las células de manera estrictamente autónoma celular.

4) El dominio Ubd-A, presente en las proteínas Ubx y AbdA podría estar implicado en la inhibición permanente de *Ubx* cuando estos dos genes son expresados a altos niveles en las células del T3.

5) El gen *engrailed* es capaz de inhibir su propia síntesis de manera permanente de una manera similar a *Ubx*, mientras que los otros dos genes del BX-C: *abd-A* y *Abd-B* no son capaces.

6) El gen *Ubx* se expresa tempranamente en las células del compartimento posterior del primordio embrionario de ala, y comienza a decaer a partir del estadio 13, siendo indetectable a partir del estadio 15.

7) El tercer segmento torácico del notum forma, en íntima asociación con una región de células posteriores del T2 una estructura denominada fragma mesotorácico, que se encuentra en la cavidad torácica de *Drosophila* pero es continua con el T2 y el abdomen de los adultos.

8) Las células del metanotum experimentan un incremento de tamaño celular (estimado en base a la superficie máxima) mucho mayor que las del mesonotum durante la metamorfosis, alcanzando un tamaño entre 2 y 3 veces mayor en la mosca adulta.

9) Las células del mesonotum sufren al menos tres rondas de proliferación celular durante la metamorfosis, mientras que las células del metanotum no son capaces de dividirse durante dicho periodo. Estas diferencias son probablemente debidas a la expresión selectiva de Ubx en el metanotum.

bibliografía

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95.
- Affolter, M. and Basler, K.** (2007). The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* **8**, 663-74.
- Akam, M. E. and Martinez-Arias, A.** (1985). The distribution of Ultrabithorax transcripts in *Drosophila* embryos. *EMBO J* **4**, 1689-700.
- Akimoto, A., Wada, H. and Hayashi, S.** (2005). Enhancer trapping with a red fluorescent protein reporter in *Drosophila*. *Dev Dyn* **233**, 993-7.
- Amores, A., Force, A., Yan, Y. L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y. L. et al.** (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* **282**, 1711-4.
- Artero, R. D., Akam, M. and Perez-Alonso, M.** (1992). Oligonucleotide probes detect splicing variants in situ in *Drosophila* embryos. *Nucleic Acids Res* **20**, 5687-90.
- Aspland, S. E. and White, R. A.** (1997). Nucleocytoplasmic localisation of extradenticle protein is spatially regulated throughout development in *Drosophila*. *Development* **124**, 741-7.
- Barolo, S., Walker, R. G., Polyanovsky, A. D., Freschi, G., Keil, T. and Posakony, J. W.** (2000). A notch-independent activity of suppressor of hairless is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell* **103**, 957-69.

- Basler, K. and Struhl, G.** (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* **368**, 208-14.
- Bate, M. y Martínez-Arias, A** (1991). "The embryonic origin of imaginal discs in *drosophila*." *Development* **112**:755-761.
- Beachy, P. A., Helfand, S. L. and Hogness, D. S.** (1985). Segmental distribution of bithorax complex proteins during *Drosophila* development. *Nature* **313**, 545-51.
- Beisel, C., Bunes, A., Roustan-Espinosa, I. M., Koch, B., Schmitt, S., Haas, S. A., Hild, M., Katsuyama, T. and Paro, R.** (2007). Comparing active and repressed expression states of genes controlled by the Polycomb/Trithorax group proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16615-20.
- Beisel, C. and Paro, R.** Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat Rev Genet* **12**, 123-35.
- Bender, W. and Fitzgerald, D. P.** (2002). Transcription activates repressed domains in the *Drosophila* bithorax complex. *Development* **129**, 4923-30.
- Bender, W. and Hudson, A.** (2000). P element homing to the *Drosophila* bithorax complex. *Development* **127**, 3981-92.
- Bender, W., Weiffenbach, B., Karch, F. and Peifer, M.** (1985). Domains of cis-interaction in the bithorax complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**, 173-80.
- Bernues, J., Pineyro, D. and Kosoy, A.** (2007). General, negative feedback mechanism for regulation of Trithorax-like gene expression in vivo: new roles for GAGA factor in flies. *Nucleic Acids Res* **35**, 7150-9.
- Beuchle, D., Struhl, G. and Muller, J.** (2001). Polycomb group proteins and heritable silencing of *Drosophila* Hox genes. *Development* **128**, 993-1004.
- Bienz, M., Saari, G., Tremml, G., Muller, J., Zust, B. and Lawrence, P. A.** (1988). Differential regulation of Ultrabithorax in two germ layers of *Drosophila*. *Cell* **53**, 567-76.
- Bienz, M. and Tremml, G.** (1988). Domain of Ultrabithorax expression in *Drosophila* visceral mesoderm from autoregulation and exclusion. *Nature* **333**, 576-8.
- Blair, S. S.** (2001). Cell lineage: compartments and Capricious. *Curr Biol* **11**, R1017-21.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Brock, H. W. and Fisher, C. L.** (2005). Maintenance of gene expression patterns. *Dev Dyn* **232**, 633-55.
- Bryant, P. J. and Simpson, P.** (1984). Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q Rev Biol* **59**, 387-415.
- Burglin, T. R.** (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res* **25**, 4173-80.
- Busturia, A. and Morata, G.** (1988). Ectopic expression of homeotic genes caused by the elimination of the Polycomb gene in *Drosophila* imaginal epidermis. *Development* **104**, 713-20.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-5.
- Capdevila, M. P. and Garcia-Bellido, A.** (1974). Development and genetic analysis of bithorax phenocopies in *Drosophila*. *Nature* **250**, 500-2.
- Casanova, J., Sanchez-Herrero, E. and Morata, G.** (1985). Prothoracic transformation and functional structure of the Ultrabithorax gene of *Drosophila*. *Cell* **42**, 663-9.

- Casares, F., Bender, W., Merriam, J. and Sanchez-Herrero, E.** (1997). Interactions of Drosophila Ultrabithorax regulatory regions with native and foreign promoters. *Genetics* **145**, 123-37.
- Casares, F., Calleja, M. and Sanchez-Herrero, E.** (1996). Functional similarity in appendage specification by the Ultrabithorax and abdominal-A Drosophila HOX genes. *EMBO J* **15**, 3934-42.
- Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G. and Akam, M.** (1994). Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development* **120**, 1983-95.
- Castelli-Gair, J. E. and Garcia-Bellido, A.** (1990). Interactions of Polycomb and trithorax with cis regulatory regions of Ultrabithorax during the development of Drosophila melanogaster. *EMBO J* **9**, 4267-75.
- Chan, S. K., Jaffe, L., Capovilla, M., Botas, J. and Mann, R. S.** (1994). The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. *Cell* **78**, 603-15.
- Chan, S. K. and Mann, R. S.** (1993). The segment identity functions of Ultrabithorax are contained within its homeo domain and carboxy-terminal sequences. *Genes Dev* **7**, 796-811.
- Chiang, A., O'Connor, M. B., Paro, R., Simon, J. and Bender, W.** (1995). Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. *Development* **121**, 1681-9.
- Chouinard, S. and Kaufman, T. C.** (1991). Control of expression of the homeotic labial (lab) locus of Drosophila melanogaster: evidence for both positive and negative autogenous regulation. *Development* **113**, 1267-80.
- Cohen, B., McGuffin, M. E., Pfeifle, C., Segal, D. and Cohen, S. M.** (1992). apterous, a gene required for imaginal disc development in Drosophila encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev* **6**, 715-29.
- Cohen, B., Simcox, A. A. and Cohen, S. M.** (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the Drosophila embryo. *Development* **117**, 597-608.
- Cohen, B., Wimmer, E. A. and Cohen, S. M.** (1991). Early development of leg and wing primordia in the Drosophila embryo. *Mech Dev* **33**, 229-40.
- Crickmore, M. A. and Mann, R. S.** (2006). Hox control of organ size by regulation of morphogen production and mobility. *Science* **313**, 63-8.
- Crickmore, M. A. and Mann, R. S.** (2007). Hox control of morphogen mobility and organ development through regulation of glypican expression. *Development* **134**, 327-34.
- Crickmore, M. A., Ranade, V. and Mann, R. S.** (2009). Regulation of Ubx expression by epigenetic enhancer silencing in response to Ubx levels and genetic variation. *PLoS Genet* **5**, e1000633.
- Danilov, V., Blum, M., Schweickert, A., Campione, M. and Steinbeisser, H.** (1998). Negative autoregulation of the organizer-specific homeobox gene gooseoid. *J Biol Chem* **273**, 627-35.
- de Navas, L., Foronda, D., Suzanne, M. and Sanchez-Herrero, E.** (2006a). A simple and efficient method to identify replacements of P-lacZ by P-Gal4 lines allows obtaining Gal4 insertions in the bithorax complex of Drosophila. *Mech Dev* **123**, 860-7.
- de Navas, L. F., Garaulet, D. L. and Sanchez-Herrero, E.** (2006b). The ultrabithorax Hox gene of Drosophila controls haltere size by regulating the Dpp pathway. *Development* **133**, 4495-506.
- Delorenzi, M. and Bienz, M.** (1990). Expression of Abdominal-B homeoproteins in Drosophila embryos. *Development* **108**, 323-9.
- Devenport, M. P., Blass, C. and Eggleston, P.** (2000). Characterization of the Hox gene cluster in the malaria vector mosquito, Anopheles gambiae. *Evol Dev* **2**, 326-39.

- Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-52.
- Dolle, P., Izpisua-Belmonte, J. C., Falkenstein, H., Renucci, A. and Duboule, D.** (1989). Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homoeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature* **342**, 767-72.
- Duboule, D.** (1991). Patterning in the vertebrate limb. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 211-6.
- Duboule, D.** (1994). Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Dev Suppl*, 135-42.
- Duboule, D. and Dolle, P.** (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J* **8**, 1497-505.
- Duboule, D. and Morata, G.** (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* **10**, 358-64.
- Duncan, I. M.** (1982). Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **102**, 49-70.
- Edgar, B. A.** (2006). From cell structure to transcription: Hippo forges a new path. *Cell* **124**, 267-73.
- Ekker, S. C., Jackson, D. G., von Kessler, D. P., Sun, B. I., Young, K. E. and Beachy, P. A.** (1994). The degree of variation in DNA sequence recognition among four *Drosophila* homeotic proteins. *EMBO J* **13**, 3551-60.
- Bürglin, T.** (1994). The Homeobox Guidebook, D. Duboule, ed. New York. Oxford Univ. Press.
- Finnerty, J. R.** (2003). The origins of axial patterning in the metazoa: how old is bilateral symmetry? *Int J Dev Biol* **47**, 523-9.
- Francis, N. J., Saurin, A. J., Shao, Z. and Kingston, R. E.** (2001). Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol Cell* **8**, 545-56.
- Frohnhofer, H. G., Lehmann, R. and Nusslein-Volhard, C.** (1986). Manipulating the anteroposterior pattern of the *Drosophila* embryo. *J Embryol Exp Morphol* **97 Suppl**, 169-79.
- Galant, R., Walsh, C. M. and Carroll, S. B.** (2002). Hox repression of a target gene: extradenticle-independent, additive action through multiple monomer binding sites. *Development* **129**, 3115-26.
- Garaulet, D. L., Foronda, D., Calleja, M. and Sanchez-Herrero, E.** (2008). Polycomb-dependent Ultrabithorax Hox gene silencing induced by high Ultrabithorax levels in *Drosophila*. *Development* **135**, 3219-28.
- Garcia-Bellido, A. and Merriam, J. R.** (1971). Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*. *Dev Biol* **26**, 264-76.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* **245**, 251-3.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1976). Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. *Dev Biol* **48**, 132-47.
- Garcia-Bellido, A. and Santamaria, P.** (1972). Developmental analysis of the wing disc in the mutant engrailed of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **72**, 87-104.
- Gerhart, J.** (1997). Cells, embryos, and evolution, *Blackwell Science*.
- Golic, K. G.** (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* **252**, 958-61.

- Gomez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferre-Marco, D. and Modolell, J.** (1996). Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* **85**, 95-105.
- Gonzalez-Crespo, S. and Morata, G.** (1995). Control of Drosophila adult pattern by extradenticle. *Development* **121**, 2117-25.
- Gonzalez-Reyes, A. and Morata, G.** (1990). The developmental effect of overexpressing a Ubx product in Drosophila embryos is dependent on its interactions with other homeotic products. *Cell* **61**, 515-22.
- Gonzalez-Reyes, A., Urquia, N., Gehring, W. J., Struhl, G. and Morata, G.** (1990). Are cross-regulatory interactions between homoeotic genes functionally significant? *Nature* **344**, 78-80.
- Gorfinkiel, N., Morata, G. and Guerrero, I.** (1997). The homeobox gene Distal-less induces ventral appendage development in Drosophila. *Genes Dev* **11**, 2259-71.
- Graham, A., Papalopulu, N. and Krumlauf, R.** (1989). The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* **57**, 367-78.
- Guerra, M., Postlethwait, J. H. and Schneiderman, H. A.** (1973). The development of the imaginal abdomen of Drosophila melanogaster. *Dev Biol* **32**, 361-72.
- Guillen, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sanchez-Herrero, E., Morata, G. and Guerrero, I.** (1995). The function of engrailed and the specification of Drosophila wing pattern. *Development* **121**, 3447-56.
- Hafen, E., Levine, M. and Gehring, W. J.** (1984). Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in Drosophila. *Nature* **307**, 287-9.
- Hama, C., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1990). Region-specific recombination and expression are directed by portions of the Drosophila engrailed promoter. *Genes Dev* **4**, 1079-93.
- Hart, K. and Bienz, M.** (1996). A test for cell autonomy, based on di-cistronic messenger translation. *Development* **122**, 747-51.
- Hayes, P. H., Sato, T. and Denell, R. E.** (1984). Homoeosis in Drosophila: the ultrabithorax larval syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 545-9.
- Hersh, B. M., Nelson, C. E., Stoll, S. J., Norton, J. E., Albert, T. J. and Carroll, S. B.** (2007). The UBX-regulated network in the haltere imaginal disc of D. melanogaster. *Dev Biol* **302**, 717-27.
- Hietakangas, V. and Cohen, S. M.** (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet* **43**, 389-410.
- Hoey, T. and Levine, M.** (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in Drosophila. *Nature* **332**, 858-61.
- Hogga, I. and Karch, F.** (2002). Transcription through the iab-7 cis-regulatory domain of the bithorax complex interferes with maintenance of Polycomb-mediated silencing. *Development* **129**, 4915-22.
- Holland, P. W.** (1999). The future of evolutionary developmental biology. *Nature* **402**, C41-4.
- Hombria, J. C. and Lovegrove, B.** (2003). Beyond homeosis—HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* **71**, 461-76.
- Horard, B., Tatout, C., Poux, S. and Pirrotta, V.** (2000). Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* **20**, 3187-97.

- Ikuta, T., Yoshida, N., Satoh, N. and Saiga, H.** (2004). *Ciona intestinalis* Hox gene cluster: Its dispersed structure and residual colinear expression in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15118-23.
- Ingham, P. W.** (1998). trithorax and the regulation of homeotic gene expression in *Drosophila*: a historical perspective. *Int J Dev Biol* **42**, 423-9.
- Ingham, P. W. and McMahon, A. P.** (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* **15**, 3059-87.
- Irvine, K. D., Botas, J., Jha, S., Mann, R. S. and Hogness, D. S.** (1993). Negative autoregulation by Ultrabithorax controls the level and pattern of its expression. *Development* **117**, 387-99.
- Jackle, H., Hoch, M., Pankratz, M. J., Gerwin, N., Sauer, F. and Bronner, G.** (1992). Transcriptional control by *Drosophila* gap genes. *J Cell Sci Suppl* **16**, 39-51.
- Johnson, F. B., Parker, E. and Krasnow, M. A.** (1995). Extradenticle protein is a selective cofactor for the *Drosophila* homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 739-43.
- Kassis, J. A.** (1994). Unusual properties of regulatory DNA from the *Drosophila* engrailed gene: three "pairing-sensitive" sites within a 1.6-kb region. *Genetics* **136**, 1025-38.
- Kassis, J. A., VanSickle, E. P. and Sensabaugh, S. M.** (1991). A fragment of engrailed regulatory DNA can mediate transvection of the white gene in *Drosophila*. *Genetics* **128**, 751-61.
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A. and Olsen, G.** (1990). Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet* **27**, 309-62.
- Kennison, J. A.** (1993). Transcriptional activation of *Drosophila* homeotic genes from distant regulatory elements. *Trends Genet* **9**, 75-9.
- Kennison, J. A.** (1995). The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu Rev Genet* **29**, 289-303.
- Kennison, J. A. and Tamkun, J. W.** (1988). Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8136-40.
- Kerridge, S. and Morata, G.** (1982). Developmental effects of some newly induced Ultrabithorax alleles of *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* **68**, 211-34.
- Khila, A., Abouheif, E. and Rowe, L.** (2009). Evolution of a novel appendage ground plan in water striders is driven by changes in the Hox gene Ultrabithorax. *PLoS Genet* **5**, e1000583.
- Kissinger, C. R., Liu, B. S., Martin-Blanco, E., Kornberg, T. B. and Pabo, C. O.** (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* **63**, 579-90.
- Kmita, M., Tarchini, B., Zakany, J., Logan, M., Tabin, C. J. and Duboule, D.** (2005). Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* **435**, 1113-6.
- Kornberg, T.** (1981). Engrailed: a gene controlling compartment and segment formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 1095-9.
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. and Simon, M.** (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* **40**, 45-53.
- Kornfeld, K., Saint, R. B., Beachy, P. A., Harte, P. J., Peattie, D. A. and Hogness, D. S.** (1989). Structure and expression of a family of Ultrabithorax mRNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in *Drosophila*. *Genes Dev* **3**, 243-58.
- Krumlauf, R.** (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**, 191-201.

- Kurant, E., Pai, C. Y., Sharf, R., Halachmi, N., Sun, Y. H. and Salzberg, A.** (1998). Dorsotons/homothorax, the *Drosophila* homologue of *meis1*, interacts with extradenticle in patterning of the embryonic PNS. *Development* **125**, 1037-48.
- Lai, E. C.** (2003). *Drosophila* tufted is a gain-of-function allele of the proneural gene *amos*. *Genetics* **163**, 1413-25.
- Lanzuolo, C. and Orlando, V.** (2007). The function of the epigenome in cell reprogramming. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1043-62.
- Lawrence, P. A. and Morata, G.** (1976). Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the engrailed gene. *Dev Biol* **50**, 321-37.
- Lawrence, P. A. and Morata, G.** (1977). The early development of mesothoracic compartments in *Drosophila*. An analysis of cell lineage and fate mapping and an assessment of methods. *Dev Biol* **56**, 40-51.
- Lawrence, P. A. and Struhl, G.** (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *drosophila*? *Cell* **85**, 951-61.
- Lawrence, P. A., Struhl, G. and Morata, G.** (1979). Bristle patterns and compartment boundaries in the tarsi of *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* **51**, 195-208.
- Lawrence** (1992). "The making of a fly." *Blackwell Scientific Publications*.
- Lee, T. and Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.
- Lewis, E. B.** (1963). Genes and developmental pathways. *Amer. Zoologist*. **3**: 33-56.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-70.
- Lewis, E. B.** (1982). Control of body segment differentiation in *Drosophila* by the bithorax gene complex. *Prog Clin Biol Res* **85 Pt A**, 269-88.
- Lopez, A. J. and Hogness, D. S.** (1991). Immunochemical dissection of the Ultrabithorax homeoprotein family in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9924-8.
- Macias, A., Casanova, J. and Morata, G.** (1990). Expression and regulation of the *abd-A* gene of *Drosophila*. *Development* **110**, 1197-207.
- Madhavan, M. M. and Madhavan, K.** (1980). Morphogenesis of the epidermis of adult abdomen of *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* **60**, 1-31.
- Madhavan, H. and Sneidermann, H.A.** (1977). "Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal disks and histoblast nests during the karval development of *drosophila melanogaster*." *Wilchem Roux's Arch. EntwMech. Org.* **183**: 269-305.
- Mahfooz, N., Turchyn, N., Mihajlovic, M., Hrycaj, S. and Popadic, A.** (2007). Ubx regulates differential enlargement and diversification of insect hind legs. *PLoS One* **2**, e866.
- Makhijani, K., Kalyani, C., Srividya, T. and Shashidhara, L. S.** (2007). Modulation of Decapentaplegic gradient during haltere specification in *Drosophila*. *Dev Biol* **302**, 243-55.
- Mallo, M., Wellik, D.M., Deschamps, J.** (2010). "Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan". *Developmental Biology* **344** (2010) 7-15
- Mann, R. S. and Abu-Shaar, M.** (1996). Nuclear import of the homeodomain protein extradenticle in response to Wg and Dpp signalling. *Nature* **383**, 630-3.
- Mann, R. S. and Chan, S. K.** (1996). Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet* **12**, 258-62.

- Mann, R. S. and Morata, G.** (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 243-71.
- Martin, F. A., Herrera, S. C. and Morata, G.** (2009). Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **136**, 3747-56.
- Martinez-Arias, A. and Lawrence, P. A.** (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature* **313**, 639-42.
- McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A. and Gehring, W. J.** (1984). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* **308**, 428-33.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L.** (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-8.
- McKeon, J., Slade, E., Sinclair, D. A., Cheng, N., Couling, M. and Brock, H. W.** (1994). Mutations in some Polycomb group genes of *Drosophila* interfere with regulation of segmentation genes. *Mol Gen Genet* **244**, 474-83.
- Merabet, S., Kambris, Z., Capovilla, M., Berenger, H., Pradel, J. and Graba, Y.** (2003). The hexapeptide and linker regions of the AbdA Hox protein regulate its activating and repressive functions. *Dev Cell* **4**, 761-8.
- Merabet, S., Saadaoui, M., Sambrani, N., Hudry, B., Pradel, J., Affolter, M. and Graba, Y.** (2007). A unique Extradenticle recruitment mode in the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16946-51.
- Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A.** (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11687-92.
- Mishra, R. K., Mihaly, J., Barges, S., Spierer, A., Karch, F., Hagstrom, K., Schweinsberg, S. E. and Schedl, P.** (2001). The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol* **21**, 1311-8.
- Moazed, D. and O'Farrell, P. H.** (1992). Maintenance of the engrailed expression pattern by Polycomb group genes in *Drosophila*. *Development* **116**, 805-10.
- Moens, C. B. and Selleri, L.** (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol* **291**, 193-206.
- Mohit, P., Makhijani, K., Madhavi, M. B., Bharathi, V., Lal, A., Sirdesai, G., Reddy, V. R., Ramesh, P., Kannan, R., Dhawan, J. et al.** (2006). Modulation of AP and DV signaling pathways by the homeotic gene Ultrabithorax during haltere development in *Drosophila*. *Dev Biol* **291**, 356-67.
- Monier, B., Astier, M., Semeriva, M. and Perrin, L.** (2005). Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. *Development* **132**, 5283-93.
- Morata, G. and Garcia-Bellido, A.** (1976). "Developmental analysis of some mutants of the bithorax system of the drosophila." *Wilhelm Roux's Archives* **179**: 125-143.
- Morata, G. and Kerridge, S.** (1981). Sequential functions of the bithorax complex of *Drosophila*. *Nature* **290**, 778-81.
- Morata, G. and Lawrence, P. A.** (1975). Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*. *Nature* **255**, 614-7.
- Morata, G. and Lawrence, P. A.** (1977). Homoeotic genes, compartments and cell determination in *Drosophila*. *Nature* **265**, 211-6.

- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M. and Chia, W.** (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15050-5.
- Moser, M. and Campbell, G.** (2005). Generating and interpreting the Brinker gradient in the *Drosophila* wing. *Dev Biol* **286**, 647-58.
- Muller, J. and Kassis, J. A.** (2006). Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 476-84.
- Ng, J., Hart, C. M., Morgan, K. and Simon, J. A.** (2000). A *Drosophila* ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. *Mol Cell Biol* **20**, 3069-78.
- Ng, M., Diaz-Benjumea, F. J., Vincent, J. P., Wu, J. and Cohen, S. M.** (1996). Specification of the wing by localized expression of wingless protein. *Nature* **381**, 316-8.
- Ninov, N., Chiarelli, D. A. and Martin-Blanco, E.** (2007). Extrinsic and intrinsic mechanisms directing epithelial cell sheet replacement during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **134**, 367-79.
- Noro, B., Lelli, K., Sun, L. and Mann, R. S.** Competition for cofactor-dependent DNA binding underlies Hox phenotypic suppression. *Genes Dev* **25**, 2327-32.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
- O'Connor, M. B., Binari, R., Perkins, L. A. and Bender, W.** (1988). Alternative RNA products from the Ultrabithorax domain of the bithorax complex. *EMBO J* **7**, 435-45.
- O'Kane, C. J. and Gehring, W. J.** (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9123-7.
- Ochman, H., Gerber, A. S. and Hartl, D. L.** (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**, 621-3.
- Oda, H. and Tsukita, S.** (2001). Real-time imaging of cell-cell adherens junctions reveals that *Drosophila* mesoderm invagination begins with two phases of apical constriction of cells. *J Cell Sci* **114**, 493-501.
- Orlando, V., Jane, E. P., Chinwalla, V., Harte, P. J. and Paro, R.** (1998). Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J* **17**, 5141-50.
- Pai, C. Y., Kuo, T. S., Jaw, T. J., Kurant, E., Chen, C. T., Bessarab, D. A., Salzberg, A. and Sun, Y. H.** (1998). The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 435-46.
- Pallavi, S. K., Kannan, R. and Shashidhara, L. S.** (2006). Negative regulation of Egfr/Ras pathway by Ultrabithorax during haltere development in *Drosophila*. *Dev Biol* **296**, 340-52.
- Papp, B. and Muller, J.** (2006). Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxB and PcG proteins. *Genes Dev* **20**, 2041-54.
- Peifer, M. and Bender, W.** (1986). The anterobithorax and bithorax mutations of the bithorax complex. *EMBO J* **5**, 2293-303.
- Peifer, M. and Wieschaus, E.** (1990). Mutations in the *Drosophila* gene extradenticle affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity. *Genes Dev* **4**, 1209-23.
- Pirrotta, V.** (1995). Chromatin complexes regulating gene expression in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 466-72.

- Poux, S., McCabe, D. and Pirrotta, V.** (2001). Recruitment of components of Polycomb Group chromatin complexes in *Drosophila*. *Development* **128**, 75-85.
- Powers, T. P., Hogan, J., Ke, Z., Dymbrowski, K., Wang, X., Collins, F. H. and Kaufman, T. C.** (2000). Characterization of the Hox cluster from the mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Evol Dev* **2**, 311-25.
- Prasad, M., Bajpai, R. and Shashidhara, L. S.** (2003). Regulation of Wingless and Vestigial expression in wing and haltere discs of *Drosophila*. *Development* **130**, 1537-47.
- Raff, R. A.** (2000). Evo-devo: the evolution of a new discipline. *Nat Rev Genet* **1**, 74-9.
- Rank, G., Prestel, M. and Paro, R.** (2002). Transcription through intergenic chromosomal memory elements of the *Drosophila* bithorax complex correlates with an epigenetic switch. *Mol Cell Biol* **22**, 8026-34.
- Rauskolb, C., Peifer, M. and Wieschaus, E.** (1993). extradenticle, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene pbx1. *Cell* **74**, 1101-12.
- Rauskolb, C., Smith, K. M., Peifer, M. and Wieschaus, E.** (1995). extradenticle determines segmental identities throughout *Drosophila* development. *Development* **121**, 3663-73.
- Rieckhof, G. E., Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M. and Mann, R. S.** (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* **91**, 171-83.
- Ringrose, L., Rehmsmeier, M., Dura, J. M. and Paro, R.** (2003). Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell* **5**, 759-71.
- Roch, F. and Akam, M.** (2000). Ultrabithorax and the control of cell morphology in *Drosophila* halteres. *Development* **127**, 97-107.
- Ronshaugen, M., McGinnis, N. and McGinnis, W.** (2002). Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan. *Nature* **415**, 914-7.
- Ryoo, H. D., Marty, T., Casares, F., Affolter, M. and Mann, R. S.** (1999). Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development* **126**, 5137-48.
- Sanchez-Herrero, E., Vernos, I., Marco, R. and Morata, G.** (1985). Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature* **313**, 108-13.
- Schmitt, S., Prestel, M. and Paro, R.** (2005). Intergenic transcription through a polycomb group response element counteracts silencing. *Genes Dev* **19**, 697-708.
- Schubiger, M. and Palka, J.** (1987). Changing spatial patterns of DNA replication in the developing wing of *Drosophila*. *Dev Biol* **123**, 145-53.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and Cavalli, G.** (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* **128**, 735-45.
- Schuettengruber, B., Martinez, A. M., Iovino, N. and Cavalli, G.** Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 799-814.
- Schwank, G., Dalessi, S., Yang, S. F., Yagi, R., de Lachapelle, A. M., Affolter, M., Bergmann, S. and Basler, K.** Formation of the long range Dpp morphogen gradient. *PLoS Biol* **9**, e1001111.
- Scott, M. P. and Weiner, A. J.** (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4115-9.
- Shashidhara, L. S., Agrawal, N., Bajpai, R., Bharathi, V. and Sinha, P.** (1999). Negative regulation of dorsoventral signaling by the homeotic gene Ultrabithorax during haltere development in *Drosophila*. *Dev Biol* **212**, 491-502.

- Shearn, A.** (1989). The ash-1, ash-2 and trithorax genes of *Drosophila melanogaster* are functionally related. *Genetics* **121**, 517-25.
- Simcox, A.** (1997). Differential requirement for EGF-like ligands in *Drosophila* wing development. *Mech Dev* **62**, 41-50.
- Simmonds, A. J., Brook, W. J., Cohen, S. M. and Bell, J. B.** (1995). Distinguishable functions for engrailed and invected in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature* **376**, 424-7.
- Simon, J. A.** (2003). Polycomb group proteins. *Curr Biol* **13**, R79-80.
- Smolik-Utlaut, S. M.** (1990). Dosage requirements of Ultrabithorax and bithoraxoid in the determination of segment identity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **124**, 357-66.
- Soshnikova, N. and Duboule, D.** (2009). Epigenetic temporal control of mouse Hox genes in vivo. *Science* **324**, 1320-3.
- Staehling-Hampton, K., Jackson, P. D., Clark, M. J., Brand, A. H. and Hoffmann, F. M.** (1994). Specificity of bone morphogenetic protein-related factors: cell fate and gene expression changes in *Drosophila* embryos induced by decapentaplegic but not 60A. *Cell Growth Differ* **5**, 585-93.
- Struhl, G. and Basler, K.** (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**, 527-40.
- Struhl, G. and White, R. A.** (1985). Regulation of the Ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell* **43**, 507-19.
- Strutt, H. and Paro, R.** (1997). The polycomb group protein complex of *Drosophila melanogaster* has different compositions at different target genes. *Mol Cell Biol* **17**, 6773-83.
- Tabata, T. and Kornberg, T. B.** (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **76**, 89-102.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-69.
- Tabata, T. and Takei, Y.** (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* **131**, 703-12.
- Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P. and Tabata, T.** (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol Cell* **5**, 59-71.
- Tessmar-Raible, K. and Arendt, D.** (2005). New animal models for evolution and development. *Genome Biol* **6**, 303.
- Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T. and Mazo, A.** (1999). Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol Cell Biol* **19**, 5189-202.
- Tiong, S., Bone, L. M. and Whittle, J. R.** (1985). Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*. *Mol Gen Genet* **200**, 335-42.
- Tour, E., Hittinger, C. T. and McGinnis, W.** (2005). Evolutionarily conserved domains required for activation and repression functions of the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Development* **132**, 5271-81.
- Tschopp, P. and Duboule, D.** A genetic approach to the transcriptional regulation of hox gene clusters. *Annu Rev Genet* **45**, 145-66.
- van Dijk, M. A. and Murre, C.** (1994). extradenticle raises the DNA binding specificity of homeotic selector gene products. *Cell* **78**, 617-24.

- Weatherbee, S. D., Halder, G., Kim, J., Hudson, A. and Carroll, S.** (1998). Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes Dev* **12**, 1474-82.
- Weigmann, K. and Cohen, S. M.** (1999). Lineage-tracing cells born in different domains along the PD axis of the developing *Drosophila* leg. *Development* **126**, 3823-30.
- White, R. A. and Wilcox, M.** (1985). Distribution of Ultrabithorax proteins in *Drosophila*. *EMBO J* **4**, 2035-43.
- Williams, J. A., Paddock, S. W. and Carroll, S. B.** (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* **117**, 571-84.
- Wu, J. and Cohen, S. M.** (2002). Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development* **129**, 2411-8.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 2265-78.
- Zecca, M. and Struhl, G.** (2002a). Control of growth and patterning of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1369-76.
- Zecca, M. and Struhl, G.** (2002b). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-68.
- Zhu, C. C., Dyer, M. A., Uchikawa, M., Kondoh, H., Lagutin, O. V. and Oliver, G.** (2002). Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development* **129**, 2835-49.

anexo I: publicaciones

Polycomb-dependent *Ultrabithorax* Hox gene silencing induced by high *Ultrabithorax* levels in *Drosophila*

Daniel L. Garaulet, David Foronda, Manuel Calleja and Ernesto Sánchez-Herrero*

The *Ultrabithorax* (*Ubx*) gene of *Drosophila* specifies the third thoracic and first abdominal segments. *Ubx* expression is controlled by several mechanisms, including negative regulation by its own product. We show here that if *Ubx* expression levels are inappropriately elevated, overriding the auto-regulatory control, a permanent repression of *Ubx* is established. This continuous repression becomes independent of the presence of exogenous *Ubx* and leads to the paradoxical result that an excess of *Ubx* results in a phenotype of *Ubx* loss. The mechanism of permanent repression depends on *Polycomb*-group genes. Absence of endogenous *Ubx* transcription when *Ubx* levels are highly elevated probably activates *Polycomb* complexes on a *Polycomb* response element located in the *Ubx* major intron. This, in turn, brings about permanent repression of *Ubx* transcription. Similar results are obtained with the gene *engrailed*, showing that this mechanism of permanent repression may be a general one for genes with negative auto-regulation when levels of expression are transiently elevated.

KEY WORDS: Hox, *Ultrabithorax*, *Polycomb*, Autoregulation, *engrailed*

INTRODUCTION

The Hox genes specify the anteroposterior (A/P) axis of bilaterians (Lewis, 1978; Duboule, 2007). They are expressed in defined domains along this axis and their mis-expression frequently causes gross alterations in the body plan. Therefore, Hox gene expression must be tightly regulated throughout development (reviewed by Carroll et al., 2001).

In *Drosophila*, the expression domains of Hox genes are set in the early embryo by the activity of gap genes (White and Lehmann, 1986; Harding and Levine, 1988; Irish et al., 1988; Casares and Sánchez-Herrero, 1996). After this initial regulation, Hox genes expression domains are maintained by two groups of genes: the *Polycomb* (*Pc*) group, which code for proteins that maintain the repression of Hox genes (and other genes); and the *trithorax* (*trx*) group, coding for proteins that maintain Hox transcription by preventing *Pc* silencing (reviewed by Schwartz and Pirrotta, 2007). *Pc*-group complexes bind to DNA in specific regions called *Polycomb* response elements (PREs) (reviewed by Müller and Kassis, 2006; Ringrose and Paro, 2007). Hox expression is also regulated by the Hox genes themselves: those expressed more posteriorly along the A/P axis downregulate the expression of those transcribed more anteriorly (Hafen et al., 1984; Struhl and White, 1985). Finally, some Hox genes control their own expression. For example, *Deformed* maintains its own transcription in cells of the epidermis and central nervous system (Kuziora and McGinnis, 1988; Lou et al., 1995). The opposite effect, negative regulation by its own product, has been described for the *Ultrabithorax* (*Ubx*) gene (Irvine et al., 1993).

Ubx expression in the embryonic epidermis extends from parasegment (PS) 5 to PS12. In the larval thorax, *Ubx* is expressed in imaginal discs of the third thoracic segment (halter disc and third leg disc) and in the posterior compartment of the second leg disc

(Beachy et al., 1985; White and Wilcox, 1985). In this region, *Ubx* mutations transform the third leg into the second one, and the haltere and metanotum (proximal part of the dorsal metathorax) into wing and mesonotum (corresponding region of the mesothorax), respectively (Lewis, 1963).

Ubx regulates negatively its own expression in the embryonic epidermis and imaginal discs (Irvine et al., 1993; Casares et al., 1997). Thus, increasing the amount of *Ubx* protein reduces *Ubx* transcription, and the opposite effect is seen with mutations that reduce its expression (Irvine et al., 1993). Changes in *Ubx* levels also modify the adult phenotype, as increasing *Ubx* dose reduces haltere size (Smolik-Utlaut, 1990; Irvine et al., 1993); conversely, heat-shock-induced *Ubx* expression occasionally brings about a very slight transformation of haltere into wing (Irvine et al., 1993). This transformation is particularly intriguing, as adding more *Ubx* seems to reduce *Ubx* activity.

We have studied this surprising result and have found that the increased expression of *Ubx* produces a strong *Ubx* mutant phenotype, but only if the high *Ubx* protein levels are transiently present in the imaginal disc cells. The transient high *Ubx* expression causes a *Pc*-group-dependent permanent inactivation of *Ubx*, probably owing to the repression of *Ubx* endogenous transcription. A similar effect is also observed in *engrailed* (*en*), a gene required to specify the development of posterior compartments. The mechanism we have uncovered, therefore, seems to be at work in different genes showing negative auto-regulation in *Drosophila* development.

MATERIALS AND METHODS

Genetics

The Gal4/UAS system (Brand and Perrimon, 1993) was used with the following drivers: *MS372-Gal4* (a gift from F. Jiménez), *Ubx-Gal4^{SS.2}* (A. Sánchez and E.S.-H.), *C-765-Gal4* (Guillén et al., 1995), *sd-Gal4* (M.C. and G. Morata, unpublished), *Ubx-Gal4^{M1}*, *Ubx-Gal4^{M3}*, *dpp-Gal4*, *en-Gal4*, *ptc-Gal4*, *ap-Gal4*, *hh-Gal4* (FlyBase; <http://flybase.bio.indiana.edu>) and with the following UAS constructs: UAS-*Ubx* (Castelli-Gair et al., 1994; Michelson, 1994), UAS-*Ubx-HA* (Ronshaugen et al., 2002), UAS-*dsRNA>Ubx* (Monier et al., 2005), UAS-*abd-A* (Michelson, 1994), UAS-*Abd-B (m)* (Castelli-Gair et al., 1994), UAS-*en* (Guillén et al., 1995), UAS-*Ubx^{UbdA}*, UAS-*Ubx^{HX}* (Merabet et al., 2007), UAS-*UbxAf* (from *Artemia*

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (C.S.I.C.-U.A.M.), Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

* Author for correspondence (e-mail: esherrero@cbm.uam.es)

franciscana) (Ronshaugen et al., 2002) and UAS-*Pcl-RNAi* (Vienna *Drosophila* RNAi Center). The *Pc*³ and *trx*^{E2} mutations, the *Df109* deletion, which eliminates *Ubx*, and the UAS-GFP reporter construct are described in FlyBase. *P-lacZ* lines inserted in the *Ubx* (*Ubx^{lac1}*) (Casares et al., 1997), *abd-A* (*HC7JA1*), *Abd-B* (*HCJ199*) (Bender and Hudson, 2000) and *en* (*ryxho25*) (Hama et al., 1990) were used as reporters of expression of the corresponding genes.

Clonal analysis

Clones expressing *Ubx* were induced in larvae of the following genotype: *y w hs-flp; tub-Gal80^{ts}/UAS-Ubx-HA; Ubx^{lac1}/tub>flu-GFP, y⁺>Gal4*. The *tub>flu-GFP, y⁺>Gal4* construct has been previously described (Zecca and Struhl, 2002). The Gal80^{ts}/Gal4 system (McGuire et al., 2003) was used to control the time of expression of the exogenous *Ubx*. Clones were marked by the absence of GFP expression and induced according to the following protocol: larvae at 48–72 hours of development, raised at 25°C, were heat-shocked at 37°C for 50 minutes to induce recombination between the FRT sequences, transferred to 29°C for 2 days (to allow Gal4 activity) and then transferred to 17°C to inactivate the Gal4 protein (McGuire et al., 2003). After several days at 17°C, the discs were fixed and scored for clones. In this and similar experiments with several temperature changes, the time of pupation is delayed.

Clones eliminating *Pc* function in a background in which *Ubx* permanent repression was established were induced according to this procedure: 24–48 hour larvae of the genotype *sd-Gal4/hs-flp; UAS-Ubx/tub-Gal80^{ts}; Ubi-GFP FRT2A/hs-CD2 ri Pc^{XT109} FRT2A*, grown at 25°C, were transferred to 29°C for 24 hours, heat-shocked for 1 hour at 37°C, grown for 1 day at 29°C and transferred to 17°C for 2 days before fixation. The *hs-CD2 ri FRT2A Pc^{XT109}* chromosome is described by Beuchle et al. (Beuchle et al., 2001).

Immunostaining

Imaginal discs were stained according to standard procedures. The antibodies used are mouse and rabbit anti-β-galactosidase (Cappel), mouse Mab4D9 anti-En (Patel et al., 1989), rat anti-haemagglutinin (Roche) and mouse anti-*Ubx* (White and Wilcox, 1984). Secondary antibodies are coupled to Red-X, Texas Red, FITC and Cy5 fluorochromes (Jackson ImmunoResearch).

In situ hybridization

Haltere discs were hybridized with a *Ubx* cDNA probe according to standard protocols (Wolff, 2000).

Adult cuticle analysis

Flies were kept in a mixture of ethanol: glycerol (3:1), cooked in 10% KOH at 60°C for 10 minutes, dissected, washed with water, dehydrated with ethanol and mounted in Euparal for inspection under a compound microscope.

X-gal staining and inverse PCR

X-gal staining was carried out as previously described (Wolff, 2000). The *P-Gal4 line Ubx-Gal4^{SS.2}* was localized by inverse PCR (<http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>).

RESULTS

The induction of high *Ubx* levels in the haltere disc results in absence of the *Ubx* protein

Ubx represses its own expression in the embryonic epidermis, and in the haltere and third leg imaginal discs (Irvine et al., 1993). This is easily observed when expressing *Ubx* with the Gal4/UAS system (Brand and Perrimon, 1993) in haltere discs of larvae carrying a *Ubx-lacZ* reporter insertion, *Ubx^{lac1}* (Casares et al., 1997). In these discs, there is strong reduction of β-galactosidase expression, indicating repression of the endogenous *Ubx* gene by the exogenous *Ubx* protein (Fig. 1B, compare with the *lacZ* expression in *Ubx^{lac1}* discs in Fig. 1A). Flies with increased *Ubx* expression present, in some GAL4/UAS combinations, a partial transformation of haltere into wing (Fig. 1D,E, compare with the wild type in Fig. 1C). A

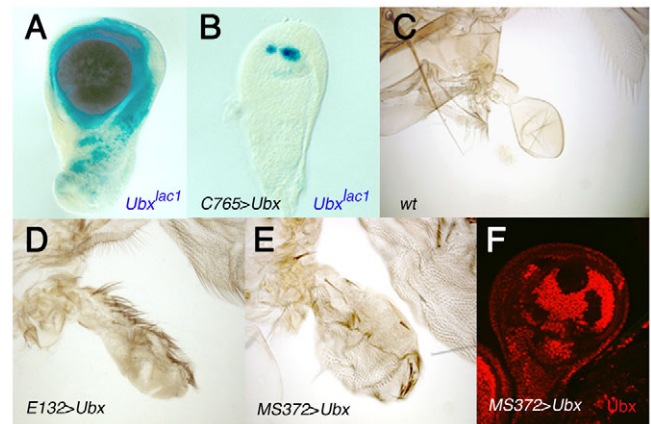


Fig. 1. Inducing high levels of *Ubx* eliminates *Ubx* protein in the haltere disc. Discs are oriented with the anterior compartment towards the left and the ventral compartment upwards. (A) Haltere imaginal disc of a *Ubx^{lac1}/TM6B* stock, showing *lacZ* expression in the disc. (B) In a *C765-Gal4/UAS-Ubx Ubx^{lac1}* haltere disc, *lacZ* expression is almost abolished and the size of the haltere is reduced. (C) Wild-type haltere. (D,E) Halteres of *E132-Gal4/UAS-Ubx* (D) and *MS372-Gal4/UAS-Ubx* (E) flies. Note the increased size, with respect to C, and the appearance of wing bristles and thricomes. (F) In a *MS372-Gal4/UAS-Ubx* haltere disc, there are patches lacking *Ubx* protein expression.

weak effect on haltere development has been described after expressing *Ubx* under heat-shock control (Irvine et al., 1993) but the transformations we observe are much stronger. Other regions of the third thoracic segment (metanotum and third leg) are also transformed into the second thoracic one (see below). By contrast, *Ubx* expression driven by other Gal4 lines do not transform the halteres into wings but reduce their size. This is similar to what has been previously described (Smolik-Utlaut, 1990; Irvine et al., 1993), and suggests that there may be some peculiarity in the Gal4 drivers that produce *Ubx* transformations when expressing *Ubx*.

These transformations are paradoxical, as providing an excess of *Ubx* protein results in a phenotype similar to that produced when eliminating the *Ubx* product. We wondered whether there could be, in addition to the repression of the endogenous *Ubx* gene, a dominant-negative effect caused by an excess of *Ubx* protein or whether, by contrast, total *Ubx* protein levels were reduced. To check this, we stained third instar haltere discs of the *MS372-Gal4/UAS-Ubx* combination, which produces *Ubx* transformations (Fig. 1E), with an anti-*Ubx* antibody. As shown in Fig. 1F, there are patches of cells that lack *Ubx* expression. Therefore, the *Ubx* phenotype is due to the absence of the *Ubx* protein.

High transient expression of exogenous *Ubx* accounts for the permanent absence of *Ubx* protein

A question posed by the previous experiments is why only some Gal4 lines elicit *Ubx* mutant transformations. It could be that these lines are repressed by *Ubx*. We studied whether this is the case with the *MS372-Gal4* line, which drives expression in the haltere disc (Fig. 2A). To distinguish the contribution of endogenous and exogenous *Ubx* proteins to the *Ubx* pattern, we monitored the endogenous *Ubx* gene (*Endo-Ubx*) with the *Ubx^{lac1}* insertion and the exogenous one (*Exo-Ubx*) by using an antibody against haemagglutinin (HA) in larvae expressing a *Ubx* protein tagged with this epitope (*Ubx-HA*) (Ronshaugen et al., 2002). Several

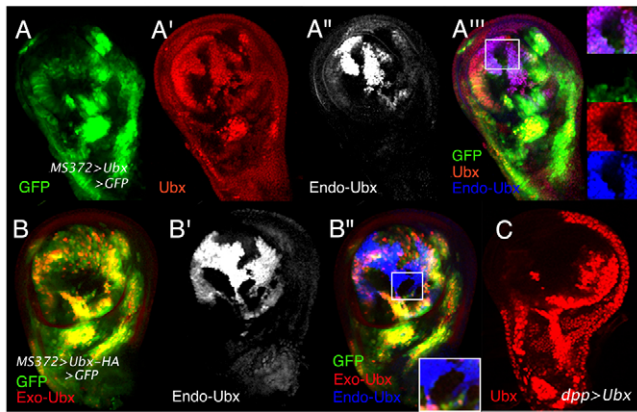


Fig. 2. Absence of endogenous (Endo-) and exogenous (Exo-) Ubx when expressing Ubx with certain Gal4 lines. (A-A''') Absence of Ubx protein (in red in A') in UAS-GFP MS372-Gal4/UAS-*Ubx* *Ubx*^{lac1} haltere discs (GFP in green in A) correlates with the absence of Endo-Ubx, detected by the expression of *Ubx*^{lac1} (A'', greyscale). Merged image in A'''. The inset indicates a region without GFP, Ubx or Endo-Ubx expression. **(B-B'')** Exo-Ubx and Endo-Ubx expression in UAS-*Ubx*-HA/+; MS372-Gal4 UAS-GFP/*Ubx*^{lac1} haltere discs. GFP is shown in B (in green), the Exo-Ubx protein is detected with an antibody against the haemagglutinin (HA) epitope (B, in red) and the Endo-Ubx with an antibody against the β -galactosidase protein (greyscale in B'). Merged image in B''. Note the coincidence of Exo-Ubx and GFP expression but not of Endo-Ubx and the absence of Endo-Ubx in many cells, probably owing to the long stability of the β -galactosidase protein. The inset indicates a region without GFP, Exo-Ubx or Endo-Ubx expression. **(C)** *Ubx* expression in a *tub*-Gal80^{ts}/+; *dpp*-Gal4 UASGFP/UAS-*Ubx* haltere disc transferred from 17 to 29°C and then back to 17°C during the larval period. *Ubx* is absent in most of the anterior compartment. Discs are oriented with the anterior compartment towards the left and the ventral compartment upwards.

conclusions can be drawn when analyzing UAS-GFP/+; MS372-Gal4/UAS-*Ubx* *Ubx*^{lac1} (Fig. 2A-A''') and UAS-*Ubx*-HA/+; MS372-Gal4 UAS-GFP/*Ubx*^{lac1} (Fig. 2B-B'') haltere discs: first, there are cells expressing both *Ubx* and GFP (Fig. 2A,A',A'''), as in the haltere discs of MS372-Gal4 UAS-GFP larvae, arguing that an increase in *Ubx* levels does not repress the driver. Second, as expected, repression of the Endo-*Ubx* gene coincides with absence of the Ubx protein (Fig. 2A',A''). Third, the Exo-*Ubx* distribution follows that of GFP (Fig. 2B), but not all the cells expressing Exo-*Ubx* repress Endo-*Ubx* (β -galactosidase signal) (Fig. 2B',B''), perhaps because of the perdurance of the β -galactosidase protein. Finally, and significantly, some cells lack GFP, Endo-*Ubx* and Exo-*Ubx* (Fig. 2A'',B'', insets). We hypothesize that these cells may derive from cells that expressed the driver only transiently, so that Exo-*Ubx* and GFP are no longer present, and in which Endo-*Ubx* transcription (previously repressed by Exo-*Ubx*) has not started again.

This idea is supported by the use of the Gal4/Gal80^{ts} system to control the time of activity of the driver (McGuire et al., 2003). In *ptc*-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-*Ubx*/*tub*-Gal80^{ts} or *tub*-Gal80^{ts}/+; *dpp*-Gal4 UAS-GFP/UAS-*Ubx* haltere discs, when larvae were transferred from 17°C, the permissive temperature of the Gal80^{ts} protein, to 29°C, the restrictive one, and back again to 17°C, *Ubx* is absent in patches of cells in the anterior compartment, which exceptionally occupy a large domain (Fig. 2C and data not shown). It is known that the *dpp* expression domain is wider in early wing discs than in late ones, where its transcription is confined to cells abutting the anteroposterior boundary (Weigmann and Cohen, 1999). Assuming similar changes

occur in the haltere disc, the transient *Ubx* expression driven by *dpp*-Gal4 (or *ptc*-Gal4) away from this boundary in early larvae may account for the absence of Ubx protein observed at late stages. Consistently, we see transformations of haltere to wing in *dpp*-Gal4/UAS-*Ubx* flies (not shown).

We have supposed that the transitory high expression of *Ubx* may repress its own transcription permanently. To check this idea, and to avoid complications using Gal4 lines with variable expression throughout development, we decided to use the *ap*-Gal4 line, which drives constant expression in the dorsal compartment of wing and haltere discs (Calleja et al., 1996) (Fig. 3A), and to temporally restrict its activity with the Gal4/Gal80^{ts} system. First, we studied Endo-*Ubx* expression when there is a continuous supply of Exo-*Ubx*. The dorsal compartment of *ap*-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-*Ubx* *Ubx*^{lac1}/+ haltere disc shows high *Ubx* levels (Fig. 3A') and complete repression of Endo-*Ubx* (Fig. 3A''). We next restricted the time when Exo-*Ubx* is synthesized. *ap*-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-*Ubx* *Ubx*^{lac1}/*tub*-Gal80^{ts} larvae (24–48 hours), grown at 17°C, were transferred to 29°C for 2 or 3 days to activate the Gal4 protein, and then grown at 17°C to suppress Gal4 activity. Haltere discs were fixed at different times after the temperature change and GFP and total Ubx protein monitored (hereafter, we refer to this protocol of temperature change as the standard protocol). We consistently observe three effects in these discs: first, a progressive decay of GFP and Ubx expression in the dorsal region, the latter at a faster rate, revealing absence of Gal4 activity after the temperature change (Fig. 3B-D'). Second, the Endo-*Ubx* expression is not restored. Even after 6 days at 17°C, when Exo-*Ubx* is no longer present, Endo-*Ubx* transcription has not resumed (Fig. 3D,D'), indicating a permanent *Ubx* repression. In situ hybridization experiments with a *Ubx* probe showed that *Ubx* transcription is similarly repressed in the dorsal compartment (not shown). Finally, because there is no Ubx protein in the dorsal compartment of the haltere disc, this is transformed into the corresponding compartment of the wing disc, and increases its size significantly (Fig. 3C,D).

These results are not explained by *Ubx* needing an exceptionally long time to restore its expression. We used a UAS-ds*Ubx*RNA construct (Monier et al., 2005) to prevent Ubx protein synthesis by RNA interference in the *ap* domain. If the larvae are kept at 29°C, there is no Ubx protein expression in the dorsal compartment (Fig. 3E), but if they undergo our standard protocol, *Ubx* expression in this compartment is almost completely restored after 4 days at 17°C (Fig. 3F). Such recovery is not observed in *ap*-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-*Ubx*/*tub*-Gal80^{ts} larvae that underwent the same temperature changes, not even after 6 or 7 days at 17°C (Fig. 3C-D' and data not shown). We conclude that a mechanism must prevent the restoration of *Ubx* transcription in the latter case.

In accordance with these results, we observe a different phenotype in halteres of flies expressing *Ubx* permanently or transiently. In *ap*-Gal4/UAS-*Ubx* flies, the halteres are reduced (Fig. 3G), as has been described previously when *Ubx* levels are increased (Smolik-Utlaut, 1990; Irvine et al., 1993). By contrast, if this increased expression is transient, a transformation of haltere into wing ensues (Fig. 3H). Similar phenotypic effects, under similar experimental regimes, are obtained when we use a *scalloped*-Gal4 (*sd*-Gal4) line, which also drives expression in the haltere disc (not shown). These experiments explain the contrasting effects obtained with different Gal4 lines when expressing *Ubx*. Those that reduce haltere size most probably maintain a fixed domain of expression throughout development, whereas those that show transformations of haltere to wing, like *dpp*-Gal4 or MS372-Gal4, vary their expression domains with time (Weigmann and Cohen, 1999) (data not shown).

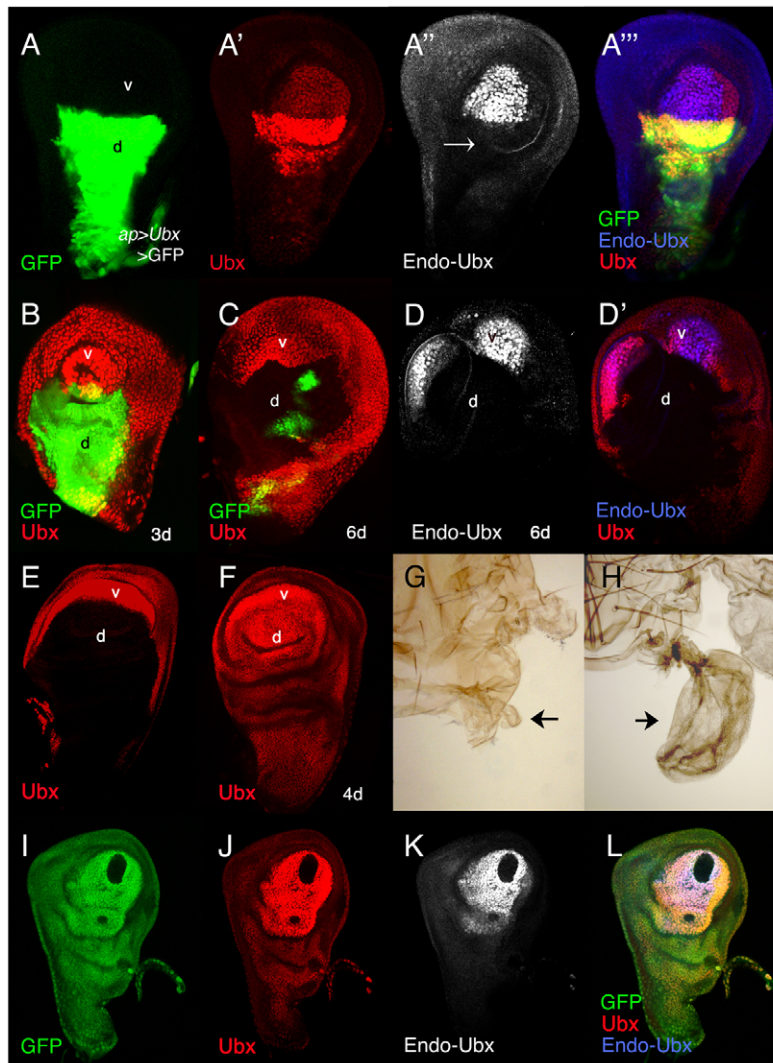


Fig. 3. A transient high amount of Ubx protein permanently represses the endogenous *Ubx* gene. (A-A''') Haltere disc of an *ap-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-Ubx Ubx^{lac1}/+* larva, grown at 17°C. GFP (A, in green) and high Ubx protein expression (A', in red) are observed in the dorsal compartment, whereas the expression of the *Ubx^{lac1}* reporter (A'', greyscale) is absent in that region (arrow). A''', merged image. In these and subsequent panels, d and v stand for dorsal and ventral compartments, respectively. (B-D') *ap-Gal4 UASGFP/+; UAS-Ubx Ubx^{lac1}/tub-Gal80^{ts}* haltere discs from larvae grown for 24-48 hours at 17°C, kept for 3 (B,D) or 2 (C) days at 29°C, and then transferred to 17°C for 3 (B, 3d) or 6 (C,D, 6d) days. Note that GFP (in green) and total Ubx (in red) protein expression progressively disappear and that the Endo-Ubx expression (D,D', greyscale and blue) is not restored. (E,F) Comparison of Ubx expression in *ap-Gal4 UAS-GFP/+; Df109 UAS-dsUbx/tub-Gal80^{ts}* haltere discs from larvae grown for 24-48 hours at 17°C and then at 29°C (E), or reared for 24-48 hours at 17°C, 3 days at 29°C and 4 days (4d) at 17°C (F). The absence of Ubx protein by repression of transcription (B-D) is permanent, whereas the absence by RNA interference allows the recovery of Ubx expression (F). (G) In *ap-Gal4/UAS-Ubx* flies, the halteres are greatly reduced (arrow). (H) By contrast, in *ap-Gal4/UAS-Ubx; tub-Gal80^{ts}/+* adults that were transferred to 17°C after being at 29°C for 2 days during the second and early third larval instars, halteres are strongly transformed into wings (arrow). (I-L) Clones marked by the absence of GFP (in green, I), which expressed Ubx-HA transiently, induced in larvae of the *hs-flp; UAS-Ubx-HA/tub-Gal80^{ts}; Ubx^{lac1}/tub>Ubi-GFP, y⁺>Gal4* genotype. Within the clone, exogenous Ubx protein is no longer present (J, in red) and the endogenous Ubx expression is continuously repressed (K, greyscale). Merged image in L. Discs are oriented with the anterior compartment towards the left and the ventral compartment upwards.

The repression of *Ubx* is maintained cell-autonomously

We wanted to know whether the permanent repression of *Ubx* by its own product is a cell autonomous effect. To this aim, we induced clones expressing transiently the Ubx product and studied exogenous, endogenous and total *Ubx* expression in these clones after several temperature changes (see Materials and methods). We observe in these clones that Endo-*Ubx* expression is continuously repressed in all the cells that previously expressed Exo-*Ubx* (even several days after the exogenous product is no longer present), but not outside it (Fig. 3I-L). This suggests that the permanent *Ubx* repression is maintained cell autonomously.

Permanent repression of an *Ubx-Gal4* line inserted close to a *Polycomb* response element

The distinct effect of lines with permanent or transient *Ubx* expression has one exception: one *Ubx-Gal4* line (*Ubx-Gal4^{SS.2}*) produced very strong transformations of haltere to wing (Fig. 4A), metanotum into mesonotum (Fig. 4B) and third leg into second leg (Fig. 4C), even though it drives constant expression in the anterior haltere disc (Fig. 4D). By contrast, when we expressed *Ubx* under the control of two other *Ubx-Gal4* lines, *Ubx-Gal4^{M1}* and *Ubx-Gal4^{M3}*, the only effect we saw was a reduction of haltere size (not shown). When we co-expressed GFP and *Ubx* with the *Ubx-Gal4^{SS.2}*

line, we observed coincident absence of both proteins in large areas of this disc (Fig. 4E-G), indicating there is repression of both *Ubx* and the Gal4 driver. By contrast, in most *UAS-GFP/+; Ubx-Gal4^{M1}/tub-Gal80^{ts}* *UAS-Ubx* haltere discs, grown for 2 days at 29°C during the larval period, there was strong GFP and *Ubx* expression in the pouch (not shown).

We guessed that the different effect of the *Ubx-Gal4^{SS.2}* line may depend on its location within the *Ubx* gene. *Ubx-Gal4^{M1}* and *Ubx-Gal4^{M3}* have been mapped upstream and close to the *Ubx* transcription start site (de Navas et al., 2006). By contrast, we have located the *Ubx-Gal4^{SS.2}* insertion to position 274.277 (coordinates according to Martin et al., 1985), very close to the *Polycomb* response element (PRE) of the *bithorax* (*bx*) region of *Ubx* (Orlando et al., 1998; Ringrose et al., 2003; Papp and Müller, 2006; Beisel et al., 2007) (Fig. 4H). We suspect that the particular position of the *Ubx-Gal4^{SS.2}* insertion may account for its different morphological effect when expressing *Ubx*.

The permanent repression of *Ubx* depends on the *Pc*-group and *trx*-group genes

The continuous repression of *Ubx* and the location of the *Ubx-Gal4^{SS.2}* insertion (with its particular properties) close to the *bx* PRE suggest that *Pc*-group genes may be part of the mechanism used for *Ubx* permanent repression. To verify this, we first

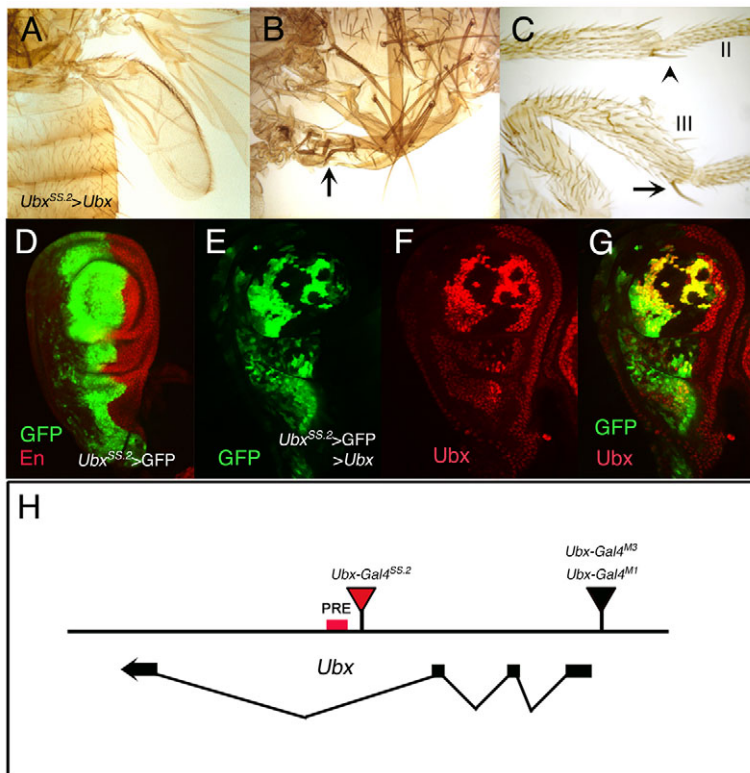


Fig. 4. The *Ubx-Gal4^{SS.2}* line is permanently repressed by high *Ubx* levels. (A–C) Transformations of haltere to wing (A), metanotum into mesonotum (B) and third leg into second one (C) in *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx* flies. The arrow in B marks mesonotum tissue appearing in the metanotum, and the arrow in C indicates an ectopic apical bristle on the third leg (III). The arrowhead indicates the wild-type apical bristle on the second leg (II). (D) Haltere disc of a *Ubx-Gal4^{SS.2}/UAS-GFP* larva, showing GFP expression (in green) in the anterior compartment. The posterior compartment is marked by En expression (in red). (E–G) Haltere disc of an *UAS-GFP/+; Ubx-Gal4^{SS.2}/UAS-Ubx* larva showing the same GFP (E, in green) and Ubx (F, in red) expression in patches of cells, indicating that the endogenous *Ubx* and the Gal4 driver are coincidentally repressed (G, merged image). (H) Map of the *Ubx* region showing the position of the *Ubx-Gal4^{SS.2}*, *Ubx-Gal4^{M3}* (de Navas et al., 2006) and *Ubx-Gal4^{SS.2}* insertions. The latter is close to the PRE. Discs are oriented with the anterior compartment towards the left and the ventral compartment upwards.

examined whether the partial transformation of halteres into wings observed in *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx* flies was modified in a *Polycomb* or *trithorax* heterozygous mutant background. In *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx/Pc³* flies there is a significant reduction in the penetrance (and expressivity) of the haltere to wing transformation when compared with the controls. An opposite effect is observed in *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx/trx^{E2}* flies (Fig. 5A). A second experiment made use of the *UAS-Pcl-RNAi* construct, which inactivates the *Polycomblike* (*Pcl*) gene, a member of the *Pc* group (Duncan, 1982). We compared the *Ubx* expression in third instar haltere discs of *ap-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-Ubx tub-Gal80^{ts}/TM6B* and *ap-Gal4 UASGFP/+; UAS-Ubx tub-Gal80^{ts}/UAS-Pcl-RNAi* larvae that went through the standard protocol of temperature changes. The area that lacks Ubx protein is much larger in the former than in the latter (Fig. 5B). Finally, we induced *Pc* mutant clones in haltere discs where permanent repression of *Ubx* had been established (see Materials and methods). In many of these clones we observed derepression of *Ubx*, strongly suggesting that *Pc* is required to maintain the *Ubx* silencing induced by high *Ubx* levels (Fig. 5C–C’).

The UbdA domain of Ubx may be needed for *Ubx* permanent repression

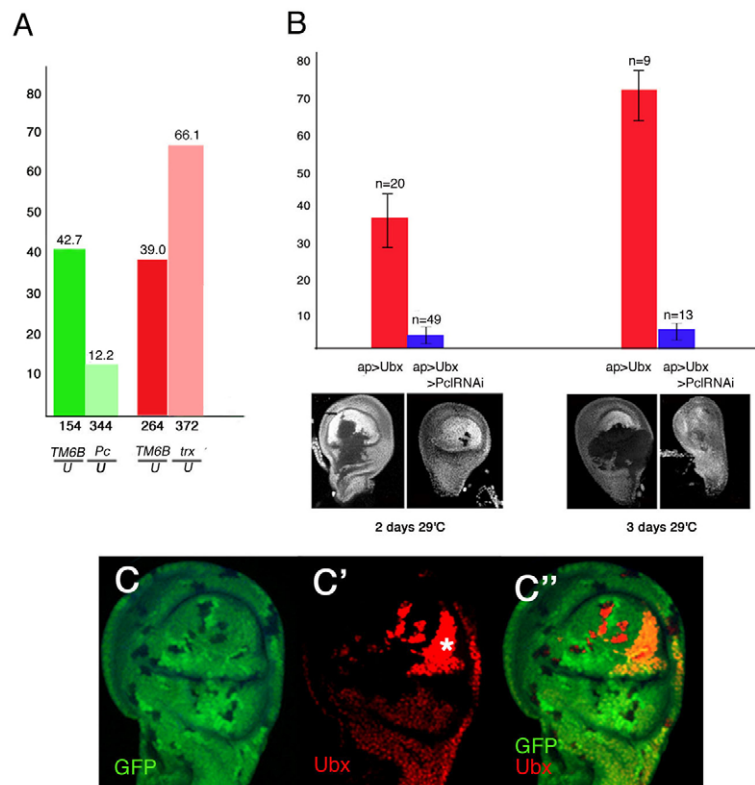
A first step in the mechanism leading to *Ubx* lasting repression is suppression of *Ubx* transcription. We reasoned that, as the *abdominal-A* (*abd-A*) and *Abdominal-B* (*Abd-B*) Hox genes downregulate *Ubx* embryonic expression (Struhl and White, 1985), they may also cause permanent repression of *Ubx* in haltere discs. In *MS372-Gal4/UAS-abd-A* haltere discs, there are large areas of *Ubx* repression that resemble those observed in the same discs of *MS372-Gal4/UAS-Ubx* larvae (Fig. 6A, compare with Fig. 1F), and *Ubx-Gal4^{SS.2}/UAS-abd-A* adults show a strong transformation of halteres into wings (Fig. 6B). As Abd-A can also make normal

halteres (Casares et al., 1996; de Navas et al., 2006), these results strongly suggest that Abd-A can repress *Ubx* permanently in haltere discs.

A different result is obtained with *Abd-B*, as in *MS372-Gal4/UAS-Abd-B* adults there is no or weak transformation of halteres into wings (Fig. 6C). To study in detail whether *Abd-B* can permanently repress *Ubx*, we first studied *Ubx* expression in *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-Abd-B(m); tub-Gal80^{ts}/+* haltere discs of larvae grown at 29°C for 3 or more days. In the dorsal compartment of such discs, *Ubx* signal disappears or is strongly reduced (Fig. 6D–G). By contrast, if larvae of this genotype are grown according to our standard protocol, and the discs fixed 4 days after the last transfer to 17°C, only a small proportion of haltere discs show patches of cells lacking Ubx protein (Fig. 6H). Consistently, only a few flies in this experiment show transformations of halteres into wings. Our conclusion is that Abd-A and Abd-B can repress *Ubx* transcription in haltere discs, but that only Abd-A can consistently induce permanent *Ubx* repression.

Ubx and Abd-A proteins share common protein motifs, like the Hexapeptide (HX) and the UbdA ones, which the Abd-B protein lacks (Chan and Mann, 1993; Bürglin, 1994; Mann and Chan, 1996). To investigate whether any of these domains accounts for the differences we detected between *Ubx* and Abd-B, we expressed *Ubx* proteins lacking either the Hexapeptide (*Ubx^{HX}*) or the Ubd-A (*Ubx^{UbdA}*) domains (Merabet et al., 2007), and analyzed whether there is permanent repression of *Ubx*. Many *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx^{HX}* flies show transformations of haltere into wing and, occasionally, of metanotum into mesonotum (Fig. 6I). Consistently, in *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-Ubx^{HX}; tub-Gal80^{ts}/+* larvae that went through our standard protocol, we see permanent repression of *Ubx* signal in the dorsal compartment of the haltere disc (Fig. 6J). By contrast, in *Ubx-Gal4^{SS.2}/UAS-Ubx^{UbdA}* flies, the halteres are not transformed into wings (Fig. 6K) and there is no permanent

Fig. 5. The *Pc* group of genes are required for the permanent *Ubx* repression. (A) Histogram showing the percentage of halteres that are transformed into wings in *UbxGal4^{SS.2} UAS-Ubx* animals in different mutant backgrounds. U stands for *UbxGal4^{SS.2} UAS-Ubx*. In each pair of columns, we show the control (TM6B; left) and the experimental (right) percentages, indicated over each column. The number of halteres scored is indicated below each column. The heterozygosity for *Pc³* decreases the percentage (and the expressivity) of the transformations, whereas the heterozygosity for *trx* increases the number of transformations. (B) Histogram showing the average percentage of the area in the dorsal compartment of the haltere disc in which *Ubx* expression is absent. The red and blue columns correspond to average percentages in *ap-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-Ubx tub-Gal80^{ts}/TM6B* and *ap-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-Ubx tub-Gal80^{ts}/UAS-Pc/RNAi* haltere discs, respectively. The data are from larvae that completed embryonic development at 17°C, were incubated for 2 (left) and 3 (right) days at 29°C, and were then transferred to 17°C. Numbers of halteres studied are above the columns. Representative examples of *Ubx* staining in the haltere discs of the corresponding days and genotypes are shown below. (C-C'') Haltere disc of a *sd-Gal4/hs-flip; UAS-Ubx/tub-Gal80^{ts}; Ubi-GFP FRT2A/hs-CD2 ri Pc^{XT109} FRT2A* larva that went through temperature changes to establish *Ubx* permanent repression (see Materials and methods) and in which several *Pc* mutant clones (marked by the absence of GFP, in green in C) were induced. There is derepression of *Ubx* in the clones (in red, C'), showing that *Pc* is required to maintain permanent repression. The weak derepression in some clones may be related to the position of the clone. There are also cells in which *Ubx* has not been repressed (asterisk). Merged image in C''.



Discs are oriented with the anterior compartment towards the left and the ventral compartment upwards.

repression of *Ubx* in *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-Ubx^{UbdA}; tub-Gal80^{ts}/+* haltere discs that underwent the standard treatment (Fig. 6L). After 5 days at 29°C, we see suppression of the *Ubx^{lac1}* reporter in most cells of the haltere disc (Fig. 6M) and if the larvae are then transferred to 17°C they give rise to adults with wild-type halteres (not shown). These results suggest that the UbdA domain may not be essential for *Ubx* repression, but for permanent *Ubx* silencing. However, the *Ubx^{UbdA}* protein downregulates, but does not suppress, *Ubx^{lac1}* expression after 3 days at 29°C (not shown), indicating that in our standard protocol the absence of silencing may be due to lack of complete *Ubx* repression. We have also observed that expressing the *Ubx* protein from the crustacean *Artemia franciscana*, with a different C-terminal domain from that of the *Drosophila* *Ubx* protein (Galant et al., 2002; Ronshaugen et al., 2002), also leads to permanent repression of *Ubx* (in *Ubx-Gal4^{SS.2} UAS-Ubx-Af* flies there is transformation of halteres into wings). Out of the domains tested, the UbdA may be the only motif in the *Ubx* protein required for *Ubx* permanent repression.

The *engrailed* gene is also permanently repressed by high levels of its protein

We have observed similar results to those of *Ubx* with the *engrailed* gene, which is required to determine the posterior identity of *Drosophila* segments and is also regulated negatively by its own product in the imaginal discs (Guillén et al., 1995; Simmonds et al., 1995; Tabata et al., 1995). Increased expression of the *en* gene driven by different Gal4 lines causes transformations of posterior-to-anterior compartments in the notum and the wing resembling those observed in weak *en* mutants (Guillén et al., 1995; Simmonds

et al., 1995; Tabata et al., 1995) (Fig. 7A-C); wing discs of these mutant combinations show elimination of the En protein in large areas (Guillén et al., 1985; Tabata et al., 1995) (Fig. 7E, compare with the wild type in Fig. 7D). We have also observed that in *en-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-en/+* wing discs, both the En and the GFP proteins disappear from the same groups of cells of the posterior compartment (Fig. 7F,G) (see also Tabata et al., 1985). This suggests that both the *en* gene and the *en-Gal4* insertion are permanently repressed by the En product. All these results point to the En protein being able to permanently repress its own expression. To confirm this inference, we have looked to En and *en-lacZ* expression (which reveals *en* endogenous expression) in larvae of the *ap-Gal4 UAS-GFP/en-lacZ; tub-Gal80^{ts}/UAS-En* genotype that have been kept 5 days at 29°C before taking them back to 17°C. After 3 days at 17°C, we do not see recovery of either *en-lacZ* or En protein expression in the dorsal posterior compartment of the wing disc (Fig. 7H-K).

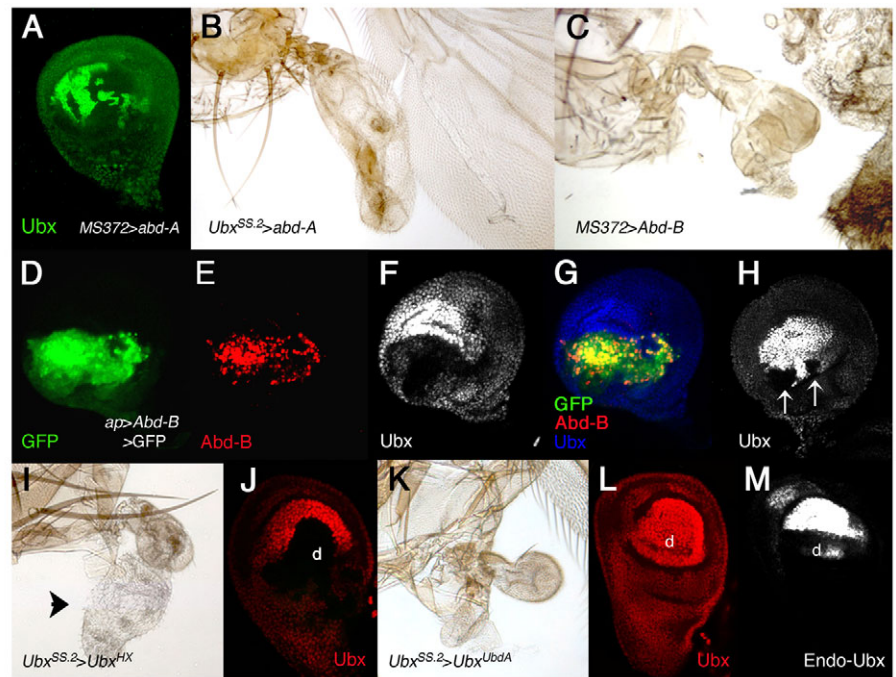
Different results are obtained when studying *abd-A* and *Abd-B*. By using P-lacZ lines as reporters of the expression of these genes in the genital disc (Bender and Hudson, 2000; Foronda et al., 2006) (D.F. and E.S.-H., unpublished), we find no repression of the endogenous gene by *Abd-A*, and downregulation, but not suppression, of the *Abd-B* reporter expression by the *Abd-B* product (see Fig. S1 in the supplementary material).

DISCUSSION

The *Ubx* and *en* selector genes are negatively regulated by their own products in imaginal discs (Irvine et al., 1993; Guillén et al., 1995; Simmonds et al., 1995; Tabata et al., 1995; Casares et al., 1997). This

Fig. 6. Effect of the Abd-A and Abd-B proteins on *Ubx* permanent repression in the haltere disc.

(A) Haltere disc of a *MS372-Gal4/UAS-abd-A* larva. *Ubx* is repressed in a large area of the disc. (B) *Ubx-Gal4^{SS.2}/UAS-abd-A* adults, showing a strong transformation of the haltere into wing. (C) In *UAS-Abd-B/+; MS372-Gal4/+* flies, there is barely an increase in haltere size and only the occasional appearance of some bristles or a small amount of wing tissue. (D–G) An *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-Abd-B; tub-Gal80^{ts}/+* haltere disc, grown for 3 days at 29°C. GFP (green, D) and Abd-B (red, E) are expressed in the dorsal compartment, whereas *Ubx* (greyscale, F) is repressed. Merged image in G. (H) In *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-Abd-B; tub-Gal80^{ts}/+* haltere discs from larvae that were grown at 17°C after 3 days at 29°C, the repression of *Ubx* is only occasionally maintained. (I) In most *UAS-Ubx^{HX}/+; UbxGal4^{SS.2}/+* adults, there are transformations of haltere into wing (arrowhead). (K) By contrast, in *UbxGal4^{SS.2}/UAS-Ubx^{UbdA}* flies, the halteres are abnormal but they are not transformed into wings. These transformations correlate with *Ubx* expression in discs that went through the standard treatment. (J, L) In *ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{ts}/UAS-Ubx^{HX}* haltere discs (J), there is repression of *Ubx* in the dorsal compartment but such repression is never observed in *ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{ts}/UAS-Ubx^{UbdA}* haltere discs (L) under the same experimental conditions. (M) In *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-Ubx^{UbdA}; Ubx^{lac1}/+* haltere discs, grown at 29°C for 5 days, there is strong repression of the *lacZ* gene in most dorsal cells. d, dorsal compartment. Magnification in I and K is the same, but different from that in B and C. Discs are oriented with the anterior compartment towards the left and the ventral compartment upwards.



is probably a compensation mechanism to cope with protein level fluctuations during development, which could interfere with the correct expression of target genes that are highly sensitive to Ubx concentration (Tour et al., 2005). High levels of Ubx in the haltere disc, for example, reduce haltere size (Smolik-Utlaut, 1990). This negative regulation demands a precise control of protein levels,

which is of high importance to fly development because, as we have seen, if such fine-tuning does not take place, the two genes are permanently inactivated.

This continuous repression is dependent on the *Pc*-group of genes. Several publications have demonstrated that transcription through a PRE in regulatory domains of the *abd-A* or *Abd-B* genes

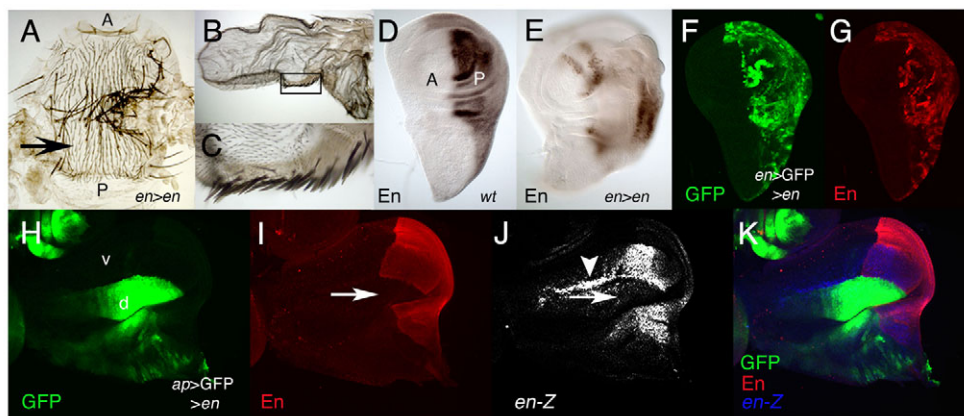


Fig. 7. Permanent repression of the *engrailed* gene induced by high Engrailed levels. (A–C) Posterior to anterior transformations in the mesonotum (A) and wing (B) of *en-Gal4/UAS-en* flies. See the duplicated notum (arrow in A) and the presence of anterior bristles in the posterior wing (C, detail of the square in B). A and P indicate anterior and posterior, respectively. (D) En expression in a wild-type wing disc. (E) En expression in an *en-Gal4/UAS-en* wing disc is confined to small groups of cells and the posterior compartment is enlarged. (F, G) GFP (F) and En (G) expression in an *en-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-en/+* wing disc is coincidentally repressed. (H–K) *ap-Gal4 UASGFP/en-lacZ; UAS-en/tub-Gal80^{ts}* wing disc from larvae grown for 5 days at 29°C and transferred to 17°C for 3 days. GFP signal (H, green) is still present (though reduced) in the *apterous* (dorsal) domain of the disc, and both En (I, in red) and β -galactosidase (J, greyscale) expression disappear in the posterior dorsal compartment (arrows). There is ectopic β -galactosidase signal in the dorsoventral boundary (arrowhead in J). Merged image in K. d and v indicate dorsal and ventral compartments, respectively. Discs are oriented with the anterior compartment towards the left and the ventral compartment upwards.

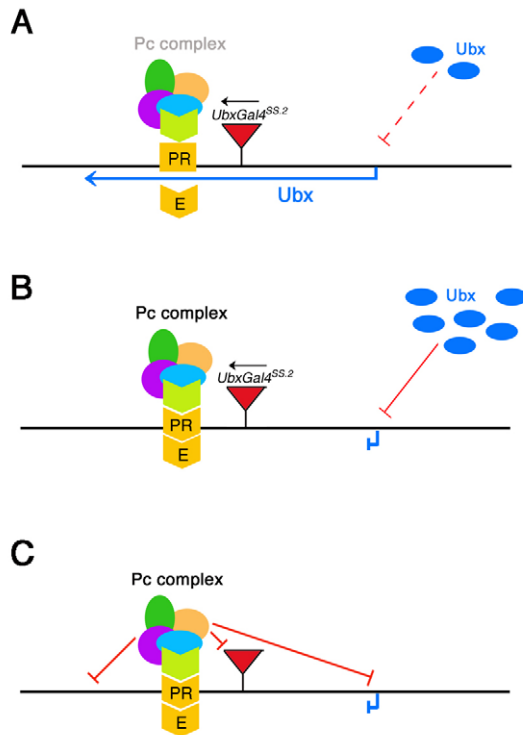


Fig. 8. Model of how an excess of Ubx may trigger permanent Ubx repression. (A) In the wild type, Ubx protein expression downregulates, but does not suppress, Ubx transcription in the haltere disc. Ubx transcription through the PRE prevents the function of Pc-group complexes either by reducing binding of some proteins to the PRE or by preventing the assembly of such complexes. (B) When Ubx protein levels are highly raised, Ubx transcription is repressed and this leads to the binding and/or activation of the Pc-group complexes at the PRE. (C) Pc-group activity prevents the expression of the Gal4 gene in the Ubx-Gal4^{SS.2} insertion and, eventually, of the Ubx gene. The UbdA domain of the decaying Ubx protein may help in this role.

results in inefficient Pc silencing, ectopic expression of the corresponding gene and homeotic transformations (Bender and Fitzgerald, 2002; Hogga and Karch, 2002; Rank et al., 2002; Schmitt et al., 2005). We assume that the phenomenon we have observed (Pc-dependent permanent repression of Ubx) makes use of a converse mechanism, that is, assembling of Pc complexes at the PRE following absence of transcription. There is a PRE located in the large Ubx intron (Chiang et al., 1995; Orlando et al., 1998) and it was suggested that Ubx transcription through this PRE may contribute to inactivation of Pc-complexes (Papp and Müller, 2006). Our results support this view. If Ubx transcription is suppressed, as it is when we force high Ubx levels, Pc-group complexes may become active at this PRE and repress the Ubx region (Fig. 8). How Ubx transcription may inactivate Pc-complexes activity is not clear. It has been proposed that transcription through a PRE may prevent binding of the complexes to the DNA (Bender and Fitzgerald, 2002; Hogga and Karch, 2002; Rank et al., 2002; Schmitt et al., 2005). However, recent experiments have demonstrated that Pc-group proteins are bound to the bx PRE in haltere discs, where Ubx is transcribed (Papp and Müller, 2006). Nevertheless, binding of some of these proteins is reduced in the haltere disc, when compared with the wing disc, suggesting that Ubx transcription may reduce this binding (Papp and Müller, 2006). Whether affecting Pc-group proteins binding or

activation, our results favor the view that Ubx transcription is a requisite to prevent Ubx silencing and that absence of transcription leads to permanent repression.

The results obtained with the Ubx-Gal4^{SS.2} line, inserted close to the bx PRE, may be relevant to this hypothesis. When this line directs expression of Ubx, there is repression of both Ubx and the Gal4 driver in the anterior haltere imaginal disc. We assume that, following repression of Ubx transcription, the Pc-group complexes at the PRE 'close' the chromatin in nearby DNA (reviewed by Müller and Kassis, 2006), thus repressing the Ubx-Gal4^{SS.2} driver (Fig. 8). This contrasts with what happens with other Ubx-Gal4 lines, located far from the PRE (de Navas et al., 2006) and in which the inactivation of the driver occurs more rarely. Our hypothesis is that, in the latter, there is repression of the Gal4 line by the exogenous Ubx product. This repression reduces Ubx protein levels, relieves endogenous Ubx repression, and the subsequent Ubx transcription through the PRE prevents Pc-mediated silencing. It is possible that Ubx does not repress the Ubx-Gal4^{SS.2} line as efficiently as the other Ubx-Gal4 lines owing to its position close to the PRE. Alternatively, the Pc-group complexes may not completely silence Ubx-Gal4^{M1} and Ubx-Gal4^{M3} insertions.

Although repression of transcription is a requisite for establishing permanent repression in the Ubx gene, it may not be sufficient. We have shown that *abd-A*, but not *Abd-B*, consistently achieve Ubx silencing in the haltere disc, although both genes repress Ubx transcription. This different behavior of Ubx/Abd-A and Abd-B proteins depends neither on the C-terminal region, which contains a conserved block of glutamines and alanines (Galant et al., 2002; Ronshaugen et al., 2002), nor on the HX motif, but may depend on the presence of the UbdA domain. The Ubx^{UbdA} protein can partially transform wings into halteres (not shown) and downregulates wing disc-specific targets (Merabet et al., 2007), but is unable to establish permanent Ubx repression under our standard protocol conditions. It is possible that the lack of permanent repression we observe when expressing *Abd-B* or Ubx^{UbdA} may be due to these proteins allowing very low levels of Ubx transcription, enough to prevent Pc-mediated permanent repression. In fact, the Ubx^{UbdA} protein needs to be present for a long time (5 days at 29°C in our experiments) to achieve complete repression of the endogenous Ubx. Alternatively, the UbdA domain may be necessary for the Ubx protein to collaborate with the establishment of Pc silencing.

If this requirement of the Ubx protein to establish Pc-dependent Ubx repression is true, it may be needed only in structures where Ubx is transcriptionally active, such as the haltere disc. Obviously, in segments anterior to PS5, repression of Ubx by Pc-group proteins cannot depend on Ubx. In this context, it is relevant to mention a specific case of Ubx repression: that occurring in the posterior wing disc. The Ubx promoter is ectopically expressed in the posterior compartment of the larval wing disc in mutations (like *bx* or *abx* mutations) that eliminate Ubx expression in this compartment (Irvine et al., 1993). This suggests there is Ubx early expression in this domain that is subsequently shut off by the Ubx protein itself (Irvine et al., 1993) and that the repression is maintained by Pc-group genes. We have found there is indeed Ubx expression in the posterior compartment of the incipient wing disc (in stage 12 embryos) and that this expression disappears from the wing disc at later embryonic stages (stage 16; see Fig. S2 in the supplementary material). Therefore, in the mature posterior wing disc there is a Pc-dependent permanent repression of Ubx that was set after a transient Ubx protein expression, similar to the mechanism we have shown. Such early expression may confer specific properties to cells that initially express Ubx. Thus, in mutations that inactivate partially a

Pc-group gene (in *Pc*/+ heterozygous, for example), ectopic *Ubx* expression is detected in the posterior compartment of the wing disc much more frequently than in the anterior one (or in other anterior discs) (e.g. Cabrera et al., 1985). This suggests that this compartment is somehow 'poised' to activate *Ubx* when the conditions of repression are reduced. There is probably a state in the chromatin that favors *Ubx* derepression in such a compartment, and this may be due to the early embryonic expression of *Ubx*.

The *en* gene, like *Ubx*, is negatively autoregulated in imaginal discs (Guillén et al., 1995; Simmonds et al., 1995; Tabata et al., 1995) and is also regulated by *Pc*-group proteins (Busturia and Morata, 1988; Moazed and O'Farrel, 1992; McKeon et al., 1994). There is a PRE in the *en* gene located upstream its transcription start site (Kassis et al., 1991; Kassis, 1994) and transcription through this PRE has been reported (Schmitt et al., 2005). We have shown that high levels of En protein permanently repress *en* expression in the wing disc. Analogous to what we have shown with the *Ubx* gene, we suppose that En may repress the expression of the transcript(s) running through the PRE (or PREs) and trigger a permanent repression through *Pc*-group complexes binding to, or being active at, the PRE. Other genes are also negatively regulated by their own products in development, such as *Drosophila* *Distal-less* (Gorfinkel et al., 1997), *labial* (Chouinard and Kaufman, 1991), *Suppressor of hairless* (Barolo et al., 2000), *brinker* (Moser and Campbell, 2005) and *trithorax-like* (Bernués et al., 2007), mouse *Six3* (Zhu et al., 2002), and *Xenopus goosecoid* (Danilov et al., 1998). These examples support the idea that many genes need to maintain stable levels of expression in development, as overriding this control may have deleterious effects. It would be interesting to know whether the mechanism we have described take place also in these genes.

We thank G. Morata and A. Busturia for discussions and for critically reading the manuscript, and K. Irvine and J. Müller for communicating unpublished results. We also thank E. Tour and W. McGinnis for the *Ubx* probe; A. Sánchez and L. Salvany for help with the experiments; M. Akam, A. Busturia, W. Bender, Y. Graba, I. Guerrero, F. Jiménez, W. McGinnis, A. Michelson, G. Morata, L. Perrin, G. Struhl, T. Tabata, R. White and the Bloomington Stock Centre for stocks, probes or antibodies; and R. González for technical assistance. This work has been supported by grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (number BMC2005-04342), the Consolider Programme of the Ministerio de Ciencia e Innovación and an Institutional Grant from the Fundación Ramón Areces. D.L.G. is supported by a fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/135/19/3219/DC1>

References

- Barolo, S., Walker, R. G., Polyanovsky, A. D., Freschi, G., Keil, T. and Posakony, J. W. (2000). A Notch-independent activity of *suppressor of hairless* is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell* **103**, 957-969.
- Beachy, P. A., Helfand, S. L. and Hogness, D. S. (1985). Segmental distribution of bithorax complex proteins during *Drosophila* development. *Nature* **313**, 545-551.
- Beisel, C., Bunes, A., Roustán-Espinosa, I. M., Koch, B., Schmitt, S., Haas, S. A., Hild, M., Katsuyama, T. and Paro, R. (2007). Comparing active and repressed expression status of genes controlled by the Polycomb/Trithorax group proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16615-16620.
- Bender, W. and Hudson, A. (2000). P element homing to the *Drosophila* bithorax complex. *Development* **127**, 3981-3992.
- Bender, W. and Fitzgerald, D. P. (2002). Transcription activates repressed domains in the *Drosophila* bithorax complex. *Development* **129**, 4923-4930.
- Bernués, J., Piñeiro, D. and Kosoy, A. (2007). General, negative feedback mechanism for regulation of *Trithorax-like* gene expression in vivo: new roles for GAGA factor in flies. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7150-7159.
- Beuchle, D., Struhl, G. and Müller, J. (2001). Polycomb group proteins and heritable silencing of *Drosophila* Hox genes. *Development* **128**, 993-1004.
- Brand, A. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Bürglin, T. (1994). *The Homeobox Guidebook* (ed. D. Duboule). New York: Oxford University Press.
- Busturia, A. and Morata, G. (1988). Ectopic expression of homeotic genes caused by the elimination of the Polycomb gene in *Drosophila* imaginal epidermis. *Development* **104**, 713-720.
- Cabrera, C., Botas, J. and García-Bellido, A. (1985). Distribution of Ultrabithorax proteins in mutants of *Drosophila* bithorax complex and its transregulatory genes. *Nature* **318**, 569-572.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-255.
- Carroll, S. B., Grenier, J. K. and Weatherbee, S. D. (2001). *From DNA to Diversity*. Oxford, UK: Blackwell Science.
- Casares, F. and Sánchez-Herrero, E. (1996). Regulation of the infraabdominal regions of the bithorax complex of *Drosophila* by gap genes. *Development* **121**, 1855-1866.
- Casares, F., Calleja, M. and Sánchez-Herrero, E. (1996). Functional similarity in appendage specification by the *Ultrabithorax* and *abdominal-A* *Drosophila* HOX genes. *EMBO J.* **15**, 3934-3942.
- Casares, F., Bender, W., Merriam, J. and Sánchez-Herrero, E. (1997). Interactions of *Drosophila* *Ultrabithorax* regulatory regions with native and foreign promoters. *Genetics* **145**, 123-137.
- Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G. and Akam, M. (1994). Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development* **120**, 1983-1995.
- Chan, S. K. and Mann, R. S. (1993). The segment identity functions of *Ultrabithorax* are contained within its homeo domain and carboxy-terminal sequences. *Genes Dev.* **7**, 796-811.
- Chiang, A., O'Connor, M. B., Paro, R., Simon, J. and Bender, W. (1995). Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. *Development* **121**, 1681-1689.
- Chouinard, S. and Kaufman, T. C. (1991). Control of expression of the homeotic labial (*lab*) locus of *Drosophila melanogaster*: evidence for both positive and negative autogenous regulation. *Development* **113**, 1267-1280.
- Danilov, V., Blum, M., Schweickert, A., Campione, M. and Steinbeisser, H. (1998). Negative autoregulation of the organizer-specific homeobox gene *goosecoid*. *J. Biol. Chem.* **273**, 627-635.
- de Navas, L. F., Foronda, D., Suzanne, M. and Sánchez-Herrero, E. (2006). A simple and efficient method to identify replacements of P-lacZ by P-Gal4 lines allows obtaining Gal4 insertions in the bithorax complex of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **123**, 860-867.
- Duboule, D. (2007). The rise and fall of Hox gene clusters. *Development* **134**, 2549-2560.
- Duncan, I. M. (1982). *Polycomblike*: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **102**, 49-70.
- Foronda, D., Estrada, B., de Navas, L. F. and Sánchez-Herrero, E. (2006). Requirement of *abdominal-A* and *Abdominal-B* in the developing genitalia of *Drosophila* breaks the posterior down-regulation rule. *Development* **133**, 117-127.
- Galant, R., Walsh, C. M. and Carroll, S. B. (2002). Hox repression of a target gene: extradenticle-independent, additive action through multiple monomer binding sites. *Development* **129**, 3115-3126.
- Gorfinkel, N., Morata, G. and Guerrero, I. (1997). The homeobox gene *Distal-less* induces ventral appendage development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 2259-2271.
- Guillén, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sánchez-Herrero, E., Morata, G. and Guerrero, I. (1995). The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* **121**, 3447-3456.
- Hafen, E., Levine, M. and Gehring, W. J. (1984). Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* **307**, 287-289.
- Hama, C., Ali, Z. and Kornberg, T. C. (1990). Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* *engrailed* promoter. *Genes Dev.* **4**, 1079-1093.
- Harding, K. and Levine, M. (1988). Gap genes define the limits of antennapedia and bithorax gene expression during early development in *Drosophila*. *EMBO J.* **7**, 205-214.
- Hayashi, S., Hirose, S., Metcalfe, T. and Shirras, A. D. (1993). Control of imaginal cell development by the *escargot* gene of *Drosophila*. *Development* **118**, 105-115.
- Hogga, I. and Karch, F. (2002). Transcription through the *iab-7* cis-regulatory domain of the bithorax complex interferes with maintenance of Polycomb-mediated silencing. *Development* **129**, 4915-4922.
- Irish, V., Martínez-Arias, A. and Akam, M. (1988). Spatial regulation of *Antennapedia* transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*. *EMBO J.* **8**, 1527-1537.
- Irvine, K. D., Botas, J., Jha, R. S., Mann, R. S. and Hogness, D. (1993). Negative autoregulation by *Ultrabithorax* controls the level and pattern of its expression. *Development* **117**, 387-399.

- Kassis, J. (1994). Unusual properties of regulatory DNA from the *Drosophila* engrailed gene: three 'pairing-sensitive' sites within a 1.6-kb region. *Genetics* **13**, 1025-1038.
- Kassis, J., VanSickle, E. P. and Sensabaugh, S. M. (1991). A fragment of engrailed regulatory DNA can mediate transvection of the white gene in *Drosophila*. *Genetics* **128**, 751-761.
- Kuziora, M. A. and McGinnis, W. (1988). Autoregulation of a *Drosophila* homeotic selector gene. *Cell* **55**, 477-485.
- Lewis, E. B. (1963). Genes and developmental pathways. *Am. Zool.* **3**, 33-56.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570.
- Lou, L., Bergson, C. and McGinnis, W. (1995). Deformed expression in the *Drosophila* central nervous system is controlled by an autoactivated intronic enhancer. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3481-3487.
- Mann, R. S. and Chan, S. K. (1996). Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet.* **12**, 258-262.
- Martin, C. H., Mayeda, C. A., Davis, C. A., Ericsson, C. L., Knafels, J. D., Mathog, D. R., Celniker, S., Lewis, E. B. and Palazzolo, M. J. (1995). Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8398-8402.
- McGuire, S. E., Le P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-1768.
- McKeon, J., Slade, E., Sinclair, D. A., Cheng, N., Couling, M. and Brock, H. W. (1994). Mutations in some Polycomb group genes of *Drosophila* interfere with regulation of segmentation genes. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 474-483.
- Merabet, S., Saadaoui, M., Sambrani, N., Hudry, B., Pradel, J., Affolter, M. and Graba, Y. (2007). A unique Extradenticle recruitment mode in the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16946-16951.
- Michelson, A. M. (1994). Muscle pattern diversification in *Drosophila* is determined by the autonomous function of homeotic genes in the embryonic mesoderm. *Development* **120**, 755-768.
- Moazed, D. and O'Farrell, P. H. (1992). Maintenance of the engrailed expression pattern by Polycomb group genes in *Drosophila*. *Development* **16**, 805-810.
- Monier, B., Astier, M., S  meriva, M. and Perrin, L. (2005). Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. *Development* **132**, 5283-5293.
- Moser, M. and Campbell, G. (2005). Generating and interpreting the Brinker gradient in the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* **286**, 647-658.
- Müller, J. and Kassis, J. A. (2006). Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 476-484.
- Orlando, V., Jane, E. P., Chinwalla, V., Harte, P. J. and Paro, R. (1998). Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J.* **17**, 5141-5150.
- Papp, B. and Müller, J. (2006). Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxB and PcG proteins. *Genes Dev.* **20**, 2041-2054.
- Patel, N. H., Martin-Blanco, E., Coleman, K. G., Poole, S. J., Ellis, M. C., Kornberg, T. B. and Goodman, C. S. (1989). Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* **58**, 955-968.
- Rank, G., Prestel, M. and Paro, R. (2002). Transcription through intergenic chromosomal memory elements of the *Drosophila* bithorax complex correlates with an epigenetic switch. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8026-8034.
- Ringrose, L. and Paro, R. (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* **134**, 223-232.
- Ringrose, L., Rehmsmeier, M., Dura, J.-M. and Paro, R. (2003). Genome-wide prediction of Polycomb/trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Cell* **5**, 759-771.
- Ronshaugen, M., McGinnis, N. and McGinnis, W. (2002). Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan. *Nature* **415**, 914-917.
- Schmitt, S., Prestel, M. and Paro, R. (2005). Intergenic transcription through a Polycomb group response element counteracts silencing. *Genes Dev.* **19**, 697-708.
- Schwartz, Y., B. and Pirrotta, V. (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 9-22.
- Simmonds, A. J., Brook, W. J., Cohen, S. M. and Bell, J. B. (1995). Distinguishable functions for engrailed and invected in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature* **376**, 424-427.
- Smolik-Utlaut, S. M. (1990). Dosage requirements of Ultrabithorax and bithoraxoid in the determination of segment identity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **124**, 357-366.
- Struhl, G. and White, R. A. (1985). Regulation of the Ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell* **43**, 507-519.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. and Kornberg, T. B. (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo: the role of engrailed, and the compartment boundary hypothesis. *Development* **121**, 3359-3369.
- Tour, E., Hittinger, C. T. and McGinnis, W. (2005). Evolutionary conserved domains required for activation and repression functions of the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Development* **132**, 5271-5281.
- Weigmann, K. and Cohen, S. M. (1999). Lineage-tracing cells born in different domains along the PD axis of the developing *Drosophila* leg. *Development* **126**, 3823-3830.
- White, R. A. H. and Wilcox, M. (1984). Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* **39**, 163-171.
- White, R. A. H. and Wilcox, M. (1985). Distribution of Ultrabithorax proteins in *Drosophila*. *EMBO J.* **4**, 2035-2043.
- White, R. A. and Lehmann, R. (1986). A gap gene, hunchback, regulates the spatial expression of Ultrabithorax. *Cell* **47**, 311-321.
- Wolff, T. (2000). Histological techniques of the *Drosophila* eye. Part I: larva and pupa. In *Drosophila Protocols* (ed. W. Sullivan, M. Ashburner and R. S. Hawley) pp. 201-227. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zecca, M. and Struhl, G. (2002). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-1368.
- Zhu, C. C., Dyer, M. A., Uchikawa, M., Kondoh, H., Lagutin, O. V. and Oliver, G. (2002). Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development* **129**, 2835-2849.